

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Renata Biba

UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA POJAVU OKSIDACIJSKOG STRESA I
EKSPRESIJU PROTEINA U KLIJANCIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum*)

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Balen, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Biljani Balen, izv. prof. na svoj ukazanoj pomoći, strpljenju i savjetima, kako u eksperimentalnom dijelu, tako i tijekom pisanja ovoga rada. Uz to, veliko hvala i dr. sc. Petri Cvjetko na svoj pomoći, razumijevanju i povjerenju pri provođenju ovoga istraživanja. Iznimno ugodna atmosfera koja je vladala u laboratoriju i izvan njega omogućila je da izrada ovog diplomskog rada bude jedno jako poučno, zanimljivo i lijepo iskustvo.

Zahvaljujem se također dr. sc. Ana-Mariji Domijan i dr. sc. Mirti Tkalec na stručnoj pomoći oko provođenja dijelova istraživanja koji su upotpunili ovaj rad, kao i kolegicama u laboratoriju koje su svojim društvom i podrškom obogatile vrijeme provedeno u njemu.

Na kraju, velike zahvale idu mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili najveća potpora i poticaj kroz cijelo moje obrazovanje i izvan njega.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA POJAVU OKSIDACIJSKOG STRESA I EKSPRESIJU PROTEINA U KLIJANCIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum*)

Renata Biba

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) odlično su protubakterijsko i protugljivično sredstvo i moguće ih je naći u brojnim potrošačkim proizvodima. Zbog potencijalne toksičnosti trenutno su u središtu mnogih istraživanja s ciljem utvrđivanja opasnosti za ekološke sustave i zdravlje ljudi. U ovom je radu istražen utjecaj AgNP na klijance duhana (*Nicotiana tabacum*), koji je uspoređen s utjecajem ionskog srebra (AgNO_3) istih koncentracija. Toksičnost AgNP zabilježena je pri visokim koncentracijama, dok je AgNO_3 imao štetno djelovanje i pri nižim koncentracijama. Izmjereni porast razine reaktivnih oblika kisika ukazao je na pojavu oksidacijskog stresa, a promjene u razini malondialdehida i proteinskih karbonila pokazale su oštećenja biološki važnih molekula. Oba oblika srebra uzrokovala su oštećenje molekule DNA, što je bilo izraženije u tretmanima s AgNO_3 . Antioksidacijski enzimi pokazali su promjenu u aktivnosti i ekspresiji; aktivnost SOD i APX se povećala, a PPX i CAT smanjila u svim tretmanima s AgNP i AgNO_3 . Došlo je i do promjene u proteinskoj slici, s naglaskom na pojačanoj ekspresiji proteina stresa Hsp70. Rezultati su pokazali da AgNO_3 ima jači toksični utjecaj na biljke od AgNP, ali da i AgNP pri povećanim koncentracijama uzrokuje oksidacijski stres i utječu na ekspresiju proteina, zbog čega predstavljaju moguću opasnost za okoliš.

(64 stranica, 24 slike, 4 tablice, 91 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: reaktivni oblici kisika, lipidna peroksidacija, proteinski karbonili, oštećenje DNA, antioksidacijski enzimi, proteini stresa

Voditelj: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof

Neposredni voditelj: dr. sc. Petra Cvjetko

Ocjenitelji: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.; dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.; dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 4.7.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON APPEARANCE OF OXIDATIVE STRESS AND PROTEIN EXPRESSION IN TOBACCO SEEDLINGS (*Nicotiana tabacum*)

Renata Biba

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Silver nanoparticles (AgNP) are excellent antibacterial and antifungal agents found in various consumer products. Due to their potential toxicity numerous studies are being conducted to determine whether they pose a threat to ecosystems and human health. In this research, the effects of AgNP on tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum*) were analysed and compared with the effects of ionic silver (AgNO_3) of the same concentrations. AgNP was toxic when applied in higher concentrations, while AgNO_3 showed harmful effects even in lower concentrations. The measured increase of reactive oxygen species indicated appearance of oxidative stress, which was proven by the increase in contents of malondialdehyde and protein carbonyls. Both silver forms caused damage to DNA molecules, which was more pronounced in AgNO_3 treatments. Antioxidative enzymes showed a change in activity and expression; the activity of SOD and APX increased, while PPX and CAT activity decreased in all treatments with AgNP and AgNO_3 . Change in protein patterns was also observed, with emphasis on the expression of stress protein Hsp70. Results indicate that AgNO_3 is more toxic for plants than AgNP; however, higher AgNP concentrations also induce oxidative stress and affect protein expression, making them potential environmental hazards.

(64 pages, 24 figures, 4 tables, 91 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein carbonyls, DNA damage, antioxidative enzymes, stress proteins

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Cosupervisor: Dr. Petra Cvjetko

Reviewers: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.; Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.; Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4.7.2016.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA – akrilamid

AgNP – nanočestice srebra

APS – amonijev peroksodisulfat

APX – askorbat peroksidaza

BFB – bromfenol plavo

Bis – N,N'-metilen-bis-akrilamid

BSA – goveđi serumski albumin

CAT – katalaza

CBB – Comassie Brilliant Blue

DHE – dihidroetidij

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

HRP – peroksidaza iz hrena

MDA – malondialdehid

NBT – nitroblue tetrazolium

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza

PBS – puferirana otopina fosfatnih soli

PPX – pirogalol peroksidaza

PVP – polivinilpirolidon

ROS – reaktivni oblici kisika

SDS – natrijev dodecil sulfat

SOD – superoksid dismutaza

TBA – tiobarbituratna kiselina

TBS – Tris pufer

TCA – trikloroctena kiselina

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nanomaterijali i njihova upotreba	1
1.1.1. Utjecaj nanomaterijala na okoliš.....	1
1.1.2. Nanočestice srebra	2
1.2. Oksidacijski stres	3
1.2.1. Lipidna peroksidacija.....	4
1.2.2. Oksidacija proteina	5
1.2.3. Oštećenja DNA	5
1.2.4. Antioksidacijski enzimi	6
1.3. Proteini stresa	8
1.3.1. Protein toplinskog šoka (Hsp70).....	8
1.3.2. Hitinaza	9
1.3.3. Protein induciran apscizinskom kiselinom i zrenjem	9
1.3.4. Protein whirly.....	9
1.4. Modelni organizam – duhan (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijal.....	12
3.1.1. Nanočestice srebra (AgNP).....	12
3.1.2. Biljni materijal	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina	13
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina	13
3.2.3. Dihidroetidij test	14
3.2.4. Određivanje sadržaja malondialdehida	14
3.2.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	15
3.2.6. Comet test	16
3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima	16
3.2.8. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom.....	20
3.2.9. Analiza ekspresije ukupnih proteina razdvajanjem natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE).....	22
3.2.10. Imunodetekcija proteina na membrani.....	24
3.3. Statistička obrada podataka	27

4. REZULTATI.....	28
4.1. Dihidroetidij test.....	28
4.2. Sadržaj malondialdehida.....	31
4.3. Sadržaj proteinskih karbonila	32
4.4. Comet test.....	33
4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	34
4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze	34
4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze	35
4.5.3. Aktivnosti askorbat peroksidaze	36
4.5.4. Aktivnost katalaze.....	37
4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu	38
4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze	38
4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze	39
4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze	40
4.6.4. Aktivnost katalaze.....	41
4.8. Ekspresija ukupnih proteina	42
4.7. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima.....	44
4.7.1. Superoksid dismutaza	44
4.7.2. Peroksidaza iz hrena.....	44
4.7.3. Askorbat peroksidaza.....	45
4.7.4. Katalaza.....	46
4.9. Ekspresija proteina stresa	46
4.9.1. Protein toplinskog šoka (Hsp70).....	46
4.9.2. Hitinaza	47
4.9.3. Protein induciran apscizinskom kiselinom i zrenjem (ASR1).....	48
4.9.4. Protein whirly1.....	48
5. RASPRAVA.....	50
6. ZAKLJUČAK	57
7. POPIS LITERATURE	58

UVOD

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali i njihova upotreba

Nanotehnologija se bavi stvaranjem funkcionalnih materijala, uređaja i sustava čija je veličina izražena na nanometarskoj razini. Prefiks nano pri tome označava faktor 10^{-9} , a obuhvaća dimenzije od 0,1 nm do 100 nm. Prema broju dimenzija koje su izražene na nanoskali razlikujemo 3 tipa nanostrukture. Nanostrukturirane površine imaju samo debljinu površine objekta izraženu na nanoskali; nanocjevčicama se promjer nalazi između 0,1 i 100 nm pa spadaju u dvodimenzijske objekte na nanoskali; a nanočestice, koje svaku prostornu dimenziju imaju na nanoskali, pripadaju trodimenzijskim nanoobjektima (Ivanković, 2011).

Napredak i dosadašnja postignuća u području nanoznanosti i nanotehnologije rezultirali su u primjeni nanomaterijala, ne samo u znanstvenoj djelatnosti, nego i mnogim proizvodima koji se nalaze na policama trgovina i ljekarna. Zato ne čudi činjenica da su istraživanja u ovom području tehnologije trenutno u punom zamahu, a u prilog tome idu i najnoviji ekonomski izvještaji o globalnom tržištu nanotehnologije koje je 2014. godine bilo procijenjeno na 26 milijardi američkih dolara s očekivanim rastom na 64,2 milijarde dolara do 2019. godine (Nanotechnology: A realistic market assessment, NAN031F).

Prema najnovijim podacima iz baza podataka (Danish Consumer Council. The Nanodatabase) na europskom tržištu se trenutno nalazi ukupno 2325 proizvoda koji sadrže nanomaterijale. Takvi materijali najčešće sadrže nanočestice srebra, titanijeva dioksida, silicijeva dioksida, cinkova oksida ili ugljika, a moguće ih je naći u kozmetičkim proizvodima, bojama, dodacima prehrani, zaštitnim premazima, filterima za vodu, odjeći i sportskoj opremi (Vance i sur., 2015).

1.1.1. Utjecaj nanomaterijala na okoliš

S obzirom na navedenu raširenost uporabe nanomaterijala, postavlja se pitanje o mogućem negativnom utjecaju na biljni i životinjski svijet. Osim proizvoda koji sadrže nanomaterijale, Nowack i sur. (2007) kao potencijalnu opasnost za organizme navode proizvodne pogone nanomaterijala, odlagališta otpada i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Navedeni objekti nanočestice ispuštaju u zrak, vodu i tlo te tako na izravan način ljude

izlažu njihovom utjecaju. Ta se izloženost dodatno povećava konzumacijom hrane i drugih proizvoda biljnog i životinjskog podrijetla koje su na identičan način u sebi akumulirale nanočestice. Vance i sur. (2015) navode kako se najveći postotak izloženosti ljudi nanomaterijalima ostvaruje putem kože (58% poznatih proizvoda), zatim kroz dišne puteve (25% proizvoda), te na kraju kroz probavni sustav (16% proizvoda).

Nanočestice predstavljaju opasnost za organizme zbog građe koja uvjetuje njihova jedinstvena električna, kemijska, optička i fotoelektrokemijska svojstva (Lanje i sur., 2010). Mala veličina čestica u kombinaciji s velikom površinom te sposobnost poticanja nastanka reaktivnih oblika kisika (ROS) igraju važnu ulogu u toksičnosti nanočestica. Takav je utjecaj vidljiv na razini cijelog organizma u obliku upala i fibroza, te na staničnoj razini gdje je vidljiva citotoksičnost i pojava oksidacijskog stresa (Nowack i sur., 2007).

1.1.2. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra koriste se u mnogim granama znanosti i industrije, poput kemije gdje služe kao katalizatori za kemijske reakcije ili energetike gdje tvore spektralno selektivne premaze za apsorpciju solarne energije (Choi i sur., 2008). Ipak, najpoznatija je upotreba nanočestica srebra kao protubakterijskih i protugljivičnih sredstava u različitim područjima života, od sterilizacije kirurških instrumenata u bolnicama do pročišćavanja otpadnih voda.

Upotreba srebra kao protubakterijskog sredstva nije novost. Još se u davnoj prošlosti srebrov nitrat koristio za liječenje spolnih bolesti, akna i vanjskih čireva, a srebrne folije upotrebljavale su se za zacijeljivanje rana i smanjenje postoperativnih infekcija. Ono što srebro čini pogodnim protubakterijskim sredstvom je činjenica da djeluje kao antibiotik širokog spektra uz smanjenu pojavu rezistencije organizama (Landsdown, 2002), što je od velike važnosti u današnjem svijetu gdje mnoge opasne bakterije ubrzano razvijaju rezistenciju na poznate antibiotike.

S obzirom na jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva koja su pokazale sintetizirane nanočestice, pretpostavilo se kako nanočestice srebra zbog jače reaktivnosti i povećanih katalitičkih svojstava mogu imati veću toksičnost za bakterije u odnosu na samo srebro. Stoga su Morones i sur. (2005) protubakterijsko djelovanje nanočestica srebra na gram negativne bakterije podijelili na tri razine. Veličina koja se obično nalazi između 1 i 10 nm omogućava im apsorpciju na površinu stanične membrane što dovodi do deaktivacije staničnih enzima te

poremećaja u propusnosti membrane i respiraciji. Uz to, takve čestice mogu ući unutar bakterije i nanijeti dodatnu štetu interakcijom s molekulom DNA. Na kraju, nanočestice srebra otpuštaju ione srebra koji mogu dodatno pojačati baktericidan učinak.

1.2. Oksidacijski stres

Svi su živi organizmi izloženi utjecaju različitih tipova stresa koji mogu biti rezultat biotičkih i abiotičkih čimbenika. Biljke, kao sesilni organizmi, nemaju mogućnost učinkovitog izbjegavanja izvora stresa pa su morale razviti mnoge prilagodbe na promijenjive okolišne uvjete.

Oksidacijski stres definiran je kao pojava neravnoteže oksidansa i antioksidansa u smjeru oksidansa, što može uzrokovati štetu u stanici (Sies, 1985). Oksidansi, koji u biljnoj stanici nastaju u procesu aerobnog metabolizma, skup su međuprodukata oksidacije vode do molekularnog kisika u fotosintetskom transportnom lancu elektrona (Arora i sur., 2002). Takvi međuprodukti tvore ROS koji mogu biti slobodni radikali (hidroksilni, peroksilni i superoksidni) ili reaktivni neradikalni derivati (singletni kisik i vodikov peroksid) (Sies, 1985). U uvjetima bez stresa antioksidacijski sustav učinkovito štiti stanicu od reaktivnih oblika kisika koji nastaju, no u stresnim uvjetima, kao što su povišeni salinitet, temperaturni ekstremi, suša ili izloženost teškim metalima, ravnoteža između oksidansa i antioksidansa može biti narušena te kapacitet antioksidacijskog obrambenog sustava može biti nedostatan za učinkovitu obranu, što ovisi o jačini oksidacijskog stresa. Umjereni oksidacijski stres aktivira antioksidacijski odgovor, pri čemu ROS ne služe samo kao indikatori stresa stanice, nego i kao signalne molekule za ekspresiju gena uključenih u biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula uključenih u obranu biljke (Mittler, 2002). Ipak, ako je izloženost uzroku stresa dugotrajna i snažna, ROS mogu ući u oksidacijske ili reduksijske reakcije s molekulama DNA, proteinima, šećerima i lipidima, te na taj način uzrokovati oštećenja i utjecati na rast i metabolizam stanice (Esterbauer i sur., 1991).

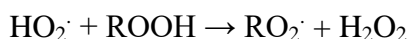
Održavanje razine ROS i prevencija oksidativnih oštećenja stanice zadatak je slojevitog obrambenog sustava sačinjenog od enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa. Halliwell i Gutteridge (1989) antioksidanse su definirali kao one tvari koje značajno usporavaju ili u potpunosti inhibiraju oksidaciju supstrata kada se u stanici nalaze u nižim koncentracijama od supstrata podložnog oksidaciji. Njihova je uloga dvojaka – inaktivacija

slobodnih radikala, tj. doniranje elektrona kako bi se spriječila lančana reakcija prijenosa nesparenih elektrona i stvaranja novih radikala te prijenos slobodnih radikala u dijelove stanice gdje će njihov oksidativni učinak biti manje štetan (Sies, 1997). Neenzimatski antioksidansi uključuju askorbinsku kiselinu, glutatone, prolin, tokoferole, karotenoide i flavonoide. Antioksidacijski enzimi uključuju superoksid dismutazu (SOD), pirogalol peroksidazu (PPX), askorbat peroksidazu (APX), katalazu (CAT) i glutation reduktazu (GR).

1.2.1. Lipidna peroksidacija

Višestruko nezasićene masne kiseline (*PolyUnsaturated Fatty Acids*, PUFA), koje izgrađuju stanične membrane, česta su meta slobodnih radikala nastalih oksidacijskim stresom organizma, što rezultira pojavom lipidne peroksidacije i utječe na cjelokupno fiziološko funkcioniranje stanice. Njihovo se oštećenje određuje mjerenjem količine nekih od krajnjih produkata ovoga procesa, najčešće malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE) i izoprostana. MDA se lako može detektirati reakcijom s tiobarbiturnom kiselinom (*ThioBarbituric Acid*, TBA) čime nastaju obojani produkti nazvani tiobarbiturne reaktivne supstance (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS).

Lipidnu peroksidaciju najčešće započinje hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2\cdot$), i to prema reakciji:



Time se iz metilenske skupine uklanja atom vodika i stvaraju slobodni lipidni radikali. Takvi radikali se nastoje stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene. U aerobnim uvjetima konjugirani dieni se spajaju s molekulom kisika stvarajući pritom peroksilne radikale $\text{LOO}\cdot$ koji mogu eliminirati $\text{H}\cdot$ iz drugih organskih molekula, uključujući PUFA-u, čime se stvaraju lipidni hiperoksidi i reaktivni ugljikovi radikali koji nastavljaju reakciju slobodnim radikalskim mehanizmom. Lipidnu peroksidaciju katalizira hemski i nehemski vezano željezo, gdje se u prisutnosti željeza LOOH disocira na $\text{LO}\cdot$ i $\text{LOO}\cdot$ čime uzrokuju nakupljanja kratkolančanih produkata peroksidacije (aldehida i ugljikovodika) i dovode do reinicijalizacije peroksidacije (Štefan i sur., 2007).

Lipidna peroksidacija i nastanak MDA na više načina utječu na funkciju membrana, smanjuju njihovu fluidnost, djeluju na transport iona i izmjenu fosfolipida između dvosloja

lipida, te u konačnici povećavaju propusnost membrane za neke tvari (Gill i Tuteja, 2010).

1.2.2. Oksidacija proteina

Najčešći način mjerenja razine oksidacije proteina jest određivanje količine proteinskih karbonila. Karbonilacija je kovalentna modifikacija aminokiselina potaknuta reaktivnim oblicima kisika i oksidacijskim stresom što uzrokuje stvaranje karbonilne skupine (aldehidi i ketoni). Karbonili mogu nastati direktnom oksidacijom nekih aminokiselina (lizin, arginin, histidin, prolin, treonin i glutaminska kiselina), oksidacijskim cijepanjem polipeptida ili vezanjem aldehida nastalih u lipidnoj peroksidaciji. Karbonilacijom se aktivnost proteina mijenja ili inhibira.

Karbonili su stabilni i pogodni su za detekciju u reakciji s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu nastaje dinitrofenil hidrazon čija koncentracija može biti spektrofotometrijski određena (Castegna i sur., 2003).

1.2.3. Oštećenja DNA

Oksidacijske promjene na molekuli DNA nastaju oksidacijskim modifikacijama nukleotidnih baza i šećera ili stvaranjem unakrsnih veza. To može rezultirati mnogim promjenama kao što su oksidacija baza i fragmentacija nastalih produkata, nastanak jedno- i dvolančanih lomova, stvaranje unakrsnih veza unutar i van lanaca DNA, te nastajanje unakrsnih veza molekule DNA sa produktima fragmentacije šećera (Balasubramanyam i sur., 2010).

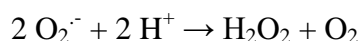
Comet test ili gel elektroforeza jedne stanice (*Single Cell Gel Electrophoresis* assay, SCGE) jednostavan je način za utvrđivanje oštećenja molekule DNA mjereći lomove na lancu DNA. Nakon provedene elektroforeze uz visoku vrijednost pH, fluorescencijskim mikroskopom se uočavaju strukture nalik kometima, a razlika u intenzitetu fluorescencije „glave“ i „repa“ kometa govori o broju lomova DNA.

1.2.4. Antioksidacijski enzimi

1.2.4.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim koji djeluje na superoksidni radikal. S obzirom da se je to prvi oblik ROS koji se formira u mnogim biološkim sustavima kao produkt jednovalentne redukcije kisika, SOD možemo smatrati primarnom obranom protiv kisikovih radikala. Uklanjanjem superoksidnog radikala umanjuje se rizik od nastanka hidroksilnog radikala putem Haber-Weissovog tipa reakcije katalizirane metalom (Arora i sur., 2002).

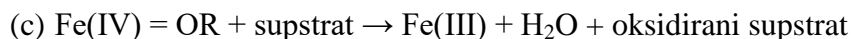
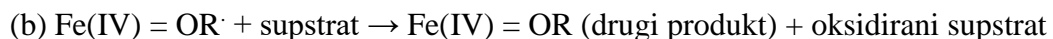
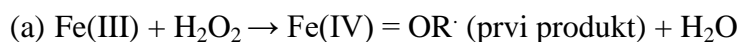
SOD katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog radikala na molekularni kisik i vodikov peroksid na sljedeći način:



Na temelju metala koji se nalazi u aktivnom mjestu, superoksid dismutaze se dijele u četiri skupine: željezo (Fe-SOD), mangan (Mn-SOD), nikal (Ni^{3+} -SOD) i bakar-cink (Cu/Zn-SOD) superoksid dismutaze, a može ih se naći u različitim odjeljcima unutar stanice (Ahmad i sur., 2010).

1.2.4.2. Peroksidaze

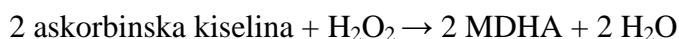
Peroksidaze obuhvaćaju skupinu enzima koji u aktivnom mjestu sadrže hem i kataliziraju niz različitih oksidativnih reakcija po sljedećoj shemi:



U ovom reakcijskom mehanizmu enzim reagira s molekulom H_2O_2 kako bi stvorio prvi produkt, oksidirani oblik peroksidaze u kojem se željezo nalazi u oksiferilnom obliku, a porfirinski prsten u obliku porfirinskog radikal-kationa, pri čemu se H_2O_2 reducira do vode (a). Prvi produkt se potom u prisutstvu donora elektrona oksidira u organski supstrat, obično aromatsku molekulu, a porfirinski radikal-kation se reducira u drugi produkt u kojem se željezo i dalje nalazi u oksiferilnom obliku (b). Reakcijom drugog produkta s novom

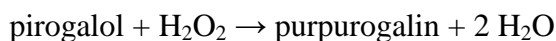
molekulom supstrata ponovo nastaje oksidirani oblik supstrata, a drugi produkt se reducira do osnovnog stanja peroksidaze, što zatvara katalitički ciklus enzima (c) (Li i Poulos, 1994).

Askorbat peroksidaza (APX) pripada skupini peroksidaza i ima ključnu ulogu u sustavu uklanjanja vodikovog peroksida u biljnoj stanici jer kao dio askorbat-glutation ciklusa katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu, pritom koristeći askorbat kao specifični donor elektrona koji se oksidira do monodehidroaskorbinske kiseline (MDHA) na sljedeći način:



Izoforme APX podijeljene su u skupine ovisno o mjestu u stanici u kojemu se nalaze. Topive izoforme nalaze se u citosolu (cAPX), mitohondriju (mitAPX) i stromi kloroplasta (sAPX), dok su netopive izoforme vezane za membrane peroksisoma i glioksisoma (mAPX) te u tilakoidima kloroplasta (tAPX) (Caverzan i sur., 2012).

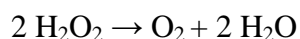
Pirogalol peroksidaza (PPX) također spada u skupinu peroksidaza, odnosno, skupinu enzima koji kataliziraju pretvorbu vodikovog peroksida u vodu. Pri tome mu kao supstrat koji donira elektrone za razgradnju vodikovog peroksida najčešće služi pirogalol, a reakcija je sljedeća:



Postoji mnogo izoformi ovoga enzima koje je moguće pronaći u različitim staničnim odjeljcima (vakuola, Golgijevo tijelo, mitohondriji i dr.) (Milošić, 2014).

1.2.4.3. Katalaze

Katalaza (CAT) je tetramerni enzim koji u svakoj od podjedinica sadrži molekulu hema. Lokalizirana je na područje peroksisoma gdje katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik prema sljedećoj reakciji:



CAT može direktno dismutirati vodikov peroksid ili oksidirati supstrate poput metanola, etanola, formaldehida ili metanske kiseline (Ahmad i sur., 2010). Ima visoku

katalitičku učinkovitost, ali izrazito nizak afinitet prema supstratu jer je za reakciju potreban simultani dolazak dvije molekule H_2O_2 u aktivno mjesto (Willekens i sur., 1995).

Biljne katalaze podijeljene su u tri skupine: prva je skupina česta u fotosintetskim tkivima gdje uklanja vodikov peroksid koji nastaje tijekom fotorespiracije; druga skupina karakteristična je za vaskularna tkiva, i iako nije poznata njihova točna uloga, pretpostavlja se da sudjeluje u lignifikaciji; treća skupina je obilna u sjemenkama i mladim biljkama gdje uklanja višak vodikovog peroksida nastalog u razgradnji masnih kiselina u gliksilatnom ciklusu (Ahmad i sur., 2010).

1.3. Proteini stresa

Oksidacijski stres u biljnoj stanici očituje se i kroz promjenu ekspresije ukupnih proteina u biljci, s naglaskom na pojačanu sintezu proteina stresa.

1.3.1. Protein toplinskog šoka (Hsp70)

Proteini toplinskog šoka štite stanice od različitih stresnih stanja. Među njima je najvažniji Hsp70, koji se nalazi u mnogim organizmima. Njegova se uloga očituje u očuvanju native konformacije proteina i pomoći u ponovnom dobivanju funkcije nakon pogrešnog namotavanja proteina, što ga svrstava u skupinu šaperona (Sharma i Masison, 2009).

Iako su proteini toplinskog šoka prvotno identificirani kao proteini čija ekspresija ovisi o toplinskom stresu, njihova je uloga važna i u ostalim stresnim stanjima, poput suše, povišenog saliniteta ili infekcija patogena (Breiman, 2014; Bhattarai i sur., 2007; Boston i sur., 1996). Sva ta stanja uzrokuju djelomično razmatanje proteina što može dovesti do smanjenja njihove funkcije. Protein Hsp70 veže se za takve razmotane hidrofobne površine kako bi spriječio nastanak nesuvislih veza koje bi dovele do agregacije proteina i kako bi potaknuo njihovo ponovno namatanje.

U eukariota je pronađeno osam izoformi proteina Hsp70, od čega su dvije specifične za pojedine organele, dok se ostalih šest nalazi u citosolu i jezgri (Sharma i Masison, 2009).

1.3.2. Hitinaza

Hitinaze su enzimi koji razgrađuju hitin, polisaharid kojega je moguće naći u gljivama, gljivicama, kvascima, algama te egzoskeletu kukaca i rakova, kao i u nekim unutrašnjim strukturama kralješnjaka. Razgradnja hitina teče u dva koraka. Hitinaze sudjeluju u prvom koraku u kojem se polimer hitina cijepa u hitinske oligosaharide, dok drugi korak, cijepanje do N-acetilglukozamina i monosaharida, izvode hitobioze.

Po građi hitinaze su glikozidne hidrolaze s veličinom od 20 kDa do 90 kDa. Moguće ih je naći u mnoštvu organizama poput bakterija, gljiva, kvasaca, biljaka, člankonožaca, pa i u ljudi. Oni čine veliku i raznovrsnu skupinu enzima koji imaju različitu molekularnu građu, specifičnost prema supstratu i katalitičke mehanizme.

U biljaka su hitinaze stalno prisutne u stabljici, cvjetovima, gomoljima i sjemenkama. Stvaraju se u mehanizmu obrane biljke od fitopatogena ili u kontaktu s elicitorima poput regulatora rasta. Nekim se hitinazama ekspresija znatno povećava u situacijama okolišnog stresa kao što su povišeni salinitet, temperaturni ekstremi i suše (Hamid i sur., 2013).

1.3.3. Protein induciran apscizinskom kiselinom i zrenjem

Proteini inducirani apscizinskom kiselinom i zrenjem (*ABA [abscisic acid]-, Stress-, and Ripening-induced, ASR*) maleni su proteini stabilni na visokim temperaturama, a njihova ekspresija snažno se pojačava kao odgovor na povećani salinitet i sušu. Izrazito su hidrofilni i služe kao kaskadne komponente u signalnoj transdukciji posredovanoj glukozom (Kim i sur., 2012).

Protein ASR1 specifičan je za biljke. Jako je nabijen i ima malu molekulsku masu. Njegova ekspresija inducirana je povišenim salinitetom, dehidracijom i prilikom tretmana s apscizinskom kiselinom (Kalifa i sur., 2004). U stanici se nalazi u citosolu i jezgri (Goldgur i sur., 2007).

1.3.4. Protein whirly

Protein whirly transkripcijski je faktor koji usklađuje popravak molekule DNA u kloroplastima i mitohondrijima biljaka vežući se na jednolančanu DNA u slučaju kada

mehanizam popravka DNA zakaže zbog jakog oštećenja. On je negativni regulator u nekonzervativnom putu popravka mikrohologno posredovane replikacije inducirane lomom (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*, MMBIR) (Cappadocia i sur., 2010).

Poznate su tri izoforme ovoga proteina: WHY1, WHY2 i WHY3, a za sve je karakteristična tetramerna građa s C4 simetrijom (Cappadocia i sur., 2013).

1.4. Modelni organizam – duhan (*Nicotiana tabacum*)

Istraživanje sam provodila na klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.). To je biljka iz porodice pomoćnica (Solanaceae) karakteristična po alkaloidu nikotinu kojega proizvodi u korijenu, a odlaže u listovima. Riječ je o zeljastoj, jednogodišnjoj biljci koja može narasti od 1 do 3 m. Listovi koji su naizmjenično postavljeni u odnosu na stabljiku ovalnog su oblika i prekriveni žljezdastim dlačicama. Cvjetovi su dvospolni i nalaze se u terminalnim nakupinama, pri čemu boja pojedinog cvijeta može varirati od bijele do crvene. Cvjetanje se odvija od srpnja do rujna, a oprašivanje obavljaju pčele i leptiri. Plod duhana je tobolac, a sjemenke su jajolikog ili bubrežastog oblika te sadrže do 40% ulja.

Nicotiana tabacum originalno potječe iz južne Amerike, no danas se uzgaja širom svijeta radi prerade osušenih listova za žvakanje i pušenje. Konzumacija duhana uzrokuje ovisnost i usko je povezana sa pojavom niza bolesti u čovjeka (rak, bolesti srca i krvnih žila, plućne bolesti) (Benowitz, 2010).

U znanosti se duhan već dugi niz godina koristi kao modelni organizam za istraživanja u biljnoj staničnoj biologiji, kulturi tkiva te molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu (Brar i sur., 1994; Flick i sur., 1984). Razlog tome je dostupnost biljke, kratko generacijsko vrijeme i lagana transformacija. Tijekom rada sa kulturom tkiva duhana, Murashige i Skoog (1962) razvili su sastav hranjivih podloga kao medija za proučavanje kulture biljaka u uvjetima *in vitro*, što je kasnije omogućilo primjenjivost na stotinama drugih biljnih organizama (Ganapathi i sur., 2004).

CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na ekonomski značaj i raširenost uporabe nanočestica srebra, nameće se pitanje u kolikoj se mjeri takve čestice ispuštaju u okoliš te kakav utjecaj imaju na njega. Ovo je istraživanje usmjereno na ispitivanje učinka nanočestica srebra i ionskog srebra na klijance duhana (*Nicotiana tabacum*), a cilj je bio:

1. Utvrditi uzrokuju li ispitivane koncentracije nanočestica srebra (i) pojavu oksidacijskog stresa u klijancima duhana, (ii) oštećenje biološki važnih molekula i (iii) promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima.
2. Utvrditi uzrokuju li ispitivane koncentracije nanočestica srebra promjene u ekspresiji ukupnih proteina u biljci te izazivaju li pojačanu ekspresiju proteina stresa.
3. Usporediti utjecaj ispitivanih koncentracija nanočestica srebra s utjecajem istih koncentracija ionskog srebra za sve prethodno navedene parametre.

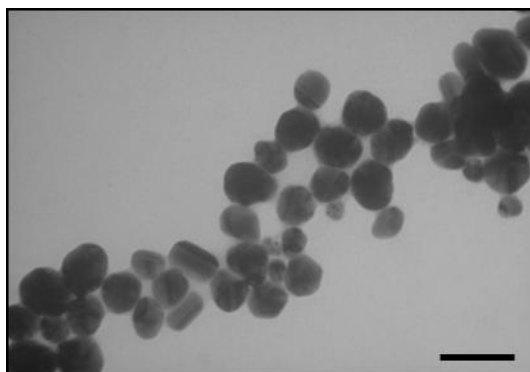
MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Nanočestice srebra (AgNP)

Nanočestice srebra (AgNP) su redukcijским postupkom pripravljene iz AgNO_3 te zatim stabilizirane pomoću negativno nabijenog citratnog aniona. Na taj način su dobivene negativno nabijene nanočestice AgNP-citrat (Slika 1).



Slika 1. Čestice nanosrebra (AgNP) pripravljene iz AgNO_3 i stabilizirane pomoću negativno nabijenog citratnog aniona (AgNP-citrat). Fotografija je snimljena pri povećanju od 85000x. Bar = 100 nm. (AgNP pripremila i snimila I. Vinković-Vrček)

3.1.2. Biljni materijal

Sjemenke duhana sterilizirala sam inkubacijom u 50%-tnoj (v/v) otopini NaOCl na mješalici u trajanju od 15 minuta. Nakon toga sam ih nekoliko puta isprala destiliranom vodom te mikropipetom nasadila na sterilizirane hranjive podloge MS (Murashige i Skoog, 1962), u koje su bile dodane otopine AgNP i AgNO_3 kako bi se postigle željene koncentracije od 25, 50, 75, 100 i 500 μM . Sjemenke su iskljavale i rasle 30 dana, nakon čega je tkivo uzorkovano i analizirano.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Klijance duhana sam pincetom izvadila iz hranidbene podloge te osušila na papirnatom ručniku. Nakon toga sam vagala 0,4 g tkiva, po 6 replika od svake koncentracije AgNP i AgNO₃. Izvagano tkivo potom sam stavljala u tarionik koji se nalazio na ledu kako bi pri ekstrakciji proteini ostali neoštećeni i zadržali svoju aktivnost. Dodala sam malo polivinilpirolidona (PVP, cca 10 mg) i 1 mL hladnog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 nakon čega je uslijedilo homogeniranje tkiva uz pomoć tučka. Homogenat je potom centrifugiran prvo 15 minuta na 14000 rpm pri 4 °C, nakon čega sam supernatante prebacila u nove tubice te ponovo centrifugirala 60 minuta na 14000 rpm pri 4 °C. Tako pripremljene uzorke prebacila sam u čiste tubice i pohranila na -20 °C kako bi se očuvali za sljedeće analize: određivanje sadržaja proteinskih karbonila, spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima, određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima u gelu, određivanje ekspresije ukupnih proteina, imunodetekcija antioksidacijskih enzima i ekspresija proteina stresa.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Prije daljnje analize proteina bilo je potrebno odrediti njihovu koncentraciju. Za to sam koristila metodu po Bradfordu (1976), koja se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) na proteine. Prvo sam napravila Bradford matičnu otopinu (0,01% CBB G-250; 31,35% (v/v) etanol; 58,6% (v/v) H₃PO₄), iz koje sam pripremila Bradford radnu otopinu (2,58% (v/v) etanol; 5,28% (v/v) H₃PO₄; 6% (v/v) Bradford matična otopina) koju sam koristila mjerenju koncentracije proteina. Baždarni pravac sam izradila pomoću otopina albumina goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL⁻¹) pripremljenih u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7,0. Za mjerenje sam u 980 µL Bradford radne otopine stavila 20 µL uzorka, tubicu sa reakcijskom smjesom sam lagano promiješala na vortexu te njen sadržaj prebacila u kivetu. Intenzitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovom otopinom mjerila sam spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju proteina u svakome uzorku, izraženu u mg mL⁻¹ otopine, dobila sam očitavanjem prethodno napravljene baždarne krivulje.

3.2.3. Dihidroetidij test

Razinu oksidacijskog stresa u stanici moguće je mjeriti detekcijom ROS-ova, a u ovom slučaju za to sam koristila dihidroetidij (DHE) test (Domijan i Abramov, 2011) i fluorescencijsku mikroskopiju. Odabrane klijance od svake ispitane koncentracije AgNP i AgNO₃ tretirala sam s 10 µL 10 µM DHE, te inkubirala u navedenoj otopini 25 minuta pri sobnoj temperaturi u plastičnoj tubici. Uzorke sam potom prenijela na predmetno stakalce te promatrala fluorescentnim mikroskopom, nakon čega je uslijedilo snimanje fotografija uporabom visokorezolucijske kamere. Analizu intenziteta fluorescencije provodila sam računalnim programom *Lucida 6.0*, mjerenjem intenziteta obojenja na 100 nasumično odabranih stanica po stakalcu. Dobiveni rezultati su prikazani prema relativnom intenzitetu u odnosu na kontrolni uzorak.

3.2.4. Određivanje sadržaja malondialdehida

Određivanju sadržaja malondialdehida (MDA) prethodila je ekstrakcija lipida. U ohlađenom tarioniku homogenirala sam 0,4 g tkiva u 1300 µL (2 x 650 µL) ekstrakcijskog pufera (0,3% (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 10% (w/v) trikloroetenoj kiselini (TCA)). Dobivene ekstrakte prelila sam u tubice za daljnju analizu.

Za određivanje razine lipidne peroksidacije u stanicama korištena je metoda prema Heathu i Packeru (1968). Ekstrakte sam 30 minuta zagrijavala na termomixeru na 95 °C u otvorenim tubicama jer smjesa vrije, zatim ih ohladila u posudi s ledom te centrifugirala 15 minuta na 8000 rpm i 4 °C. Supernatante sam prelila u kivete te mjerila apsorbanciju pomoću spektrofotometra na 532 nm i 600 nm, te od vrijednosti očitane na 532 oduzela vrijednost očitane na 600 nm što predstavlja korekciju za nespecifično zamućenje. Kao slijepe probe koristila sam 200 µL kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 pomiješanog sa 1300 µL prethodno navedenog reakcijskog pufera. Koncentraciju lipidnih peroksida izrazila sam kao koncentraciju MDA u µmol g⁻¹ svježe tvari prema jednadžbi:

$$\text{sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times \epsilon \times l} \text{ [}\mu\text{mol g}^{-1} \text{ svježe tvari]}$$

gdje je:

A_{532} – apsorbancija izmjerena na 532 nm

A_{600} – apsorbancija izmjerena na 600 nm

m – masa tkiva (g)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Za određivanje sadržaja proteinskih karbonila koristila sam metodu prema Levinu i sur. (1994). Za to sam pripremila 2 seta plastičnih tubica. U prvi set sam stavila 200 μL ekstrakata (poglavlje 3.2.1) i dodala 300 μL 10 mM dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl. U drugi set, koji je služio kao kontrola, stavila sam također 200 μL uzorka te dodala 300 μL 2 M HCl. Sadržaje tubica oba seta promiješala sam uz pomoć vortexa, te ostavila u mraku na sobnoj temperaturi jedan sat, uz povremeno potresanje. U sve sam uzorke zatim stavila 500 μL 10%-tne TCA za precipitaciju proteina, te ih ostavila na -20°C 5 minuta. Nakon toga uzorke sam centrifugirala 10 minuta na 14000 rpm na 4°C , odlila supernatant, a nastali talog ispirala 3 puta sa po 500 μL otopine etanol/etilacetat u omjeru 1:1 kako bi se uklonio nevezani reagens. Talog sam na kraju otapala u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2,4, a kako bih samo otapanje ubrzala koristila sam vortex. Pri spektrofotometrijskom mjerenju svaki uzorak s DNPH imao je svoju slijepu probu bez DNPH, a apsorbancija se mjerila pri 370 nm. Sadržaj proteinskih karbonila izrazila sam prema jednadžbi:

$$\text{sadržaj karbonila} = \frac{A_{370}}{m \times \varepsilon \times l} [\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina}]$$

gdje je:

A_{370} – apsorbancija izmjerena na 370 nm

m – koncentracija proteina ($\text{mg}_{\text{proteina}} \text{ mL}^{-1}$)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.6. Comet test

Oštećenja molekule DNA detektirala sam i izmjerila primjenom Comet testa (Gichner i sur., 2004). Jezgre stanica mehanički sam izolirala radeći rezove žiletom po klijancima uronjenima u 250 μ L 400 mM 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol-HCl (Tris-HCl) pH 7,5 pri 4 °C, te ih pomiješala s jednakom količinom agaroze niskog tališta (*Low Melting Point*, LMP, 1% (w/v) u puferiranoj otopini fosfatnih soli (eng. *Phosphate Buffer Saline*, PBS; 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) koja je prethodno bila zagrijana na 42 °C. Ovu smjesu nanijela sam na predmetna stakalca na kojima se nalazila 1% (w/v) agarosa normalnog tališta (*Normal Melting Point*, NMP) u destiliranoj vodi. Pokrila sam ih pokrovnicom i ostavila na ledu kako bi se agarosa učvrstila. Prije prijenosa predmetnih stakalaca u posudu za horizontalnu elektroforezu uklonila sam pokrovna stakalca, a posudu ispunila hladnim puferom za elektroforezu (1 mM Na₂EDTA i 300 mM NaOH, pH > 13). Stakalca su prvo stajala u posudi s puferom 10 minuta kako bi došlo do denaturacije DNA, nakon čega je pokrenuta elektroforeza pri 0,8 V cm⁻¹ i 300 mA kroz 20 minuta. Nakon elektroforeze stakalca su tri puta po 5 minuta isprana neutralizacijskim puferom (400 mM Tris-HCl, pH 7,5) te na kraju uronjena u destiliranu vodu.

Stakalca za analizu bojana su sa 70 μ L etidijevog bromida (20 μ g mL⁻¹) u periodu od 5 minuta. Sa svakog je stakalca izabrano 150 jezgara za analizu fluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom BP 520/09 nm i graničnim filterom od 610 nm. Postotak DNA u repu (%DNA), kao primarna mjera oštećenja DNA, mjeren je računalnim programom *Komet ver.5*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika.

3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.2.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost superoksid dismutaze mjerena je prema metodi Beauchamp i Fridovicha (1971). Na početku sam pripremila otopine za mjerenje (slijepa proba bez izvora superoksidnog radikala i bez SOD) i maksimalnu apsorbanciju neinhirirane kontrole. U 800 μ L reakcijske smjese (13 mM metionin, 75 μ M nitroblue tetrazolium (NBT) i 0,1 M etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) ulila sam 190 μ L kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 i 10 μ L otopine 2 mM riboflavina. Odmah po stavljanju riboflavina, smjese u kivetama sam izmiješala i na 8 minuta izložila djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W). NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih

radikala u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 560 nm. Kao slijepa proba korištena je navedena smjesa koja nije izložena djelovanju svjetlosti. Nakon toga sam u već navedenoj smjesi smanjila količinu kalij-fosfatnog pufera te dodala proporcionalnu količinu uzorka kontrole (poglavlje 3.2.1), ponavljajući postupak, kako bih dobila smanjenje apsorbancije od 50%. Uslijedio je identičan postupak sa svim uzorcima zadanih koncentracija, kao i sa SOD standardima tj. serijom razrijeđenja otopina poznatih koncentracija SOD u rasponu od 0,025 do 1 U μL^{-1} . Nakon mjerenja, dobiveni rezultati su linearizirani na način da su vrijednosti aktivnosti maksimuma (neinhibirana kontrola) podijeljeni s onom dobivenom za uzorke, odnosno SOD standarde. Uz pomoć SOD standarda izradila sam baždarnu krivulju na temelju koje sam izračunala aktivnosti SOD za svaki pojedini uzorak. Aktivnost SOD izražena je kao U $\text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$, odnosno, $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX)

Za određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze koristila sam metodu prema Nakano i Asada (1981). Na početku sam pripremila reakcijsku smjesu koja se sastoji od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera u kojem je otopljeno 0,126 g pirogalola te neposredno prije korištenja dodano 5,5 μL H_2O_2 . Takav reagens potrebno je zamotati u foliju ili pohraniti u tamnu bocu. Kao slijepu probu koristila sam 980 μL navedene reakcijske smjese u koju sam dodala 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, a za uzorke sam pomiješala 980 μL reakcijske smjese sa 20 μL prethodno pripremljenih ekstrakta (poglavlje 3.2.1). Aktivnost sam mjerila na valnoj duljini od 430 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute (spektrofotometar ATI/Unicam UV4-110, Cambridge, UK).

Aktivnost PPX izrazila sam kao količinu nastalog produkta u $\mu\text{mol min}^{-1}$ po mg proteina prema jednadžbi:

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A(\text{s.v.}) \times 4 \times V(\text{r.s.}) \times \text{F.R.}}{V(\text{uz}) \times \epsilon \times l} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}]$$

$$PPX = \frac{\Delta A \mu\text{mol}/\text{min mL}}{\text{mg}(\text{proteina})/\text{mL}} [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A(\text{s.v.})$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm u 15 s

4 – faktor korekcije za $\Delta A(\text{s.v.})$ za izražavanje rezultata u minuti

$V(\text{r.s.})$ – volumen reakcijske smjere (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(\text{uz})$ – volumen uzorka (0,02 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.7.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

Aktivnost askorbat peroksidaze mjerena je prema metodi Nakana i Asade (1981). Za to sam pripremila otopine 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, 12 mM H_2O_2 , 10 mM askorbinske kiseline te pufer 1 sastavljen od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 500 μL 10 mM EDTA. Za slijepu probu pomiješala sam 800 μL pufera 1, 180 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H_2O_2 . Za samo mjerenje pomiješala sam 800 μL pufera 1, 180 μL uzorka (poglavlje 3.2.1), 10 μL mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H_2O_2 . Slijepe probe i uzorke stavila sam u kvarcne kivete, a aktivnost sam mjerila na 290 nm. Zbog oksidacije askorbinske kiseline mjerila sam pad apsorbancije svaku sekundu tijekom 15 sekundi.

Aktivnost APX izrazila sam kao količinu nastalog produkta u $\mu\text{mol min}^{-1}$ po mg proteina prema jednadžbi:

$$APX = \frac{\Delta A(\text{s.v.}) \times 4 \times V(\text{r.s.}) \times \text{F.R.}}{V(\text{uz}) \times \varepsilon \times l} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}]$$

$$APX = \frac{\Delta A \mu\text{mol}/\text{min mL}}{\text{mg}(\text{proteina})/\text{mL}} [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A(\text{s.v.})$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm u 15 s

4 – faktor korekcije za $\Delta A(\text{s.v.})$ za izražavanje rezultata u minuti

$V(\text{r.s.})$ – volumen reakcijske smjere (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(\text{uz})$ – volumen uzorka (0,18 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.7.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Metoda prema Aebi (1984) korištena je za određivanje aktivnosti enzima katalaze. Za pripravu reakcijske smjese pomiješala sam 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 sa 51 μL otopine H_2O_2 . Kao slijepa proba poslužila je smjesa 950 μL reakcijske otopine i 50 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, dok sam za mjerenje uzoraka pomiješala 950 μL reakcijske smjese i 50 μL ekstrakta (poglavlje 3.2.1). Aktivnost ovoga enzima mjerila sam na 240 nm svakih 10 sekundi tijekom dvije minute. Uslijed utroška H_2O_2 apsorbancija je kontinuirano padala.

Aktivnost CAT izrazila sam kao količinu utrošenog H_2O_2 u $\mu\text{mol min}^{-1}$ po mg proteina prema jednadžbi:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A(\text{s.v.}) \times 6 \times V(\text{s.r.}) \times \text{F.R.}}{V(\text{uz}) \times \varepsilon \times l} [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}]$$

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \mu\text{mol}/\text{min mL}}{\text{mg}(\text{proteina})/\text{mL}} [\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A(\text{s.v.})$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm u 10 s

6 – faktor korekcije za $\Delta A(s.v.)$ za izražavanje rezultata u minuti

V(r.s.) – volumen reakcijske smjere (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V(uz) – volumen uzorka (0,05 mL)

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent ($40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.8. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom

Enzime u stanicama moguće je naći u velikom broju izoformi koje se mogu razdvojiti nativnom elektroforezom jer njihova elektroforetska pokretljivost ovisi o gustoći naboja molekule, molekulskoj masi i izoelektričnoj točki (Balen i sur. 2011).

Za nativnu elektroforezu pripremila sam otopine za gelove prema uputama (Tablica 1.) i izlila ih u sendvič sastavljen od staklenih ploča koje su prethodno očišćene 96%-tnim etanolom, kako je opisano u Balen i sur. (2011). Nakon polimerizacije gelova, staklene ploče sam prenijela na elektrodni nosač te u kadicu u kojoj se sve nalazi ulila elektrodni pufer. Proteinske ekstrakte sam prije nanošenja u jažice pomiješala s 10 μL 0,5%-tne otopine saharoze i boje bromfenol plavo (*BromoPhenol Blue*, BFB), pri čemu saharoza služi kako bi uzorcima povećala gustoću i osigurala njihovo sjedanje u jažice, a boja BFB olakšava praćenje tijekom same elektroforeze. Na gel sam nanosila 100 μg proteina po jažici. Elektroforeza se provodila u kadici *PROTEAN® II xi cell* (Bio-Rad) na 4 °C; prvih 45 minuta tekla je pri 100 V kako bi uzorci ušli u gel za razdvajanje, nakon čega sam napon povišala na 220 V i tako ostavila do kraja.

Tablica 1. Sastav gela za elektroforezu u nativnim uvjetima.

	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentriranje (4%)
reH ₂ O	16,8 mL	6,1 mL
Tris-HCl	1,5 M; pH 8,8; 10 mL	0,5 M; pH 6,8; 2,5 mL
akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	13,2 mL	1,3 mL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	200 μL	50 μL
tetrametiletildiamin (TEMED)	20 μL	10 μL

Nakon elektroforeze uslijedilo je tretiranje gelova i vizualizacija vrpce ovisno o enzimu koji se istražuje.

3.2.8.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu

3.2.8.1.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi superoksid dismutaze (SOD)

Gel na kojemu sam određivala aktivnost superoksid dismutaze nakon elektroforeze sam 25 minuta inkubirala u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 u kojemu je bilo otopljeno 100 mg NBT. Nakon toga gel sam inkubirala u otopini 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 u koju sam dodala 100 μ L 2 mM riboflavina i 425 μ L TEMED-a 15 minuta u tami. Gel sam zatim izložila djelovanju svjetlosti transiluminatora sve do pojave vrpce zadovoljavajućeg intenziteta (Beauchamp i Fridovich, 1971). Izoforme SOD su se pojavile kao akromatske vrpce na plavoljubičastoj podlozi. Nakon toga gel sam izvadila iz otopine i skenirala.

3.2.8.1.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze (PPX)

Za detekciju vrpce u gelu nakon provođenja native elektroforeze koristila sam metodu prema Chance i Maehly (1955). Gel sam prvo inkubirala 30 minuta u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Nakon toga je slijedila inkubacija od 20 minuta u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 u koji sam dodala 0,252 g pirogalola i 40 μ L H₂O₂. Nakon 5-10 minuta pojavile su se žuto-smeđe vrpce izoenzima peroksidaze. Gel sam odmah skenirala jer se stajanjem obojenje brzo gubi.

3.2.8.1.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze (APX)

Pri elektroforezi uzoraka za detekciju vrpce povezanih s askorbat peroksidazom, uz prethodno navedenu proceduru, u 5 L elektrodnog pufera otopila sam 1,761 g askorbinske kiseline. Nakon elektroforeze gel sam inkubirala 3 puta po 10 minuta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 7,0 u kojem je otopljeno 0,212 g askorbinske kiseline. Uslijedila je inkubacija u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 7,0 uz dodatak 0,14 g askorbinske kiseline i 41 μ L H₂O₂, u trajanju od 20 minuta. Nakon jednogminutnog ispiranja u 50 mM kalij-

fosfatnom puferu pH 7,0, gel je inkubiran u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH 7,8 u koji sam dodala 860 μL TEMED-a i 0,3 g NBT-a (Mittler i Zilinkas, 1993). U toj otopini gel se nalazio 10 do 15 minuta, nakon čega su se izoforme pojavile kao akromatske vrpce na plavoljubičastoj podlozi i gel je skeniran.

3.2.8.1.4. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze (CAT)

Detekciju aktivnosti i broja izoformi katalaze provodila sam prema protokolu Woodbury i sur. (1971). Gel sam na početku ispirala u destiliranoj vodi 3 puta po 15 minuta. Nakon toga slijedila je inkubacija od 10 minuta u 100 mL destilirane vode kojoj sam dodala 51 μL H_2O_2 . Za to vrijeme pripremila sam dvije otopine, prvu otapanjem 0,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ u 50 mL destilirane vodi i drugu otapanjem 0,5 g FeCl_3 u 50 mL destilirane vode. Nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi, gel sam inkubirala u smjesi nastaloj miješanjem prethodno navedenih otopina soli željeza sve do pojave žuto obojenih vrpce na zelenoj podlozi, nakon čega sam gel skenirala.

3.2.9. Analiza ekspresije ukupnih proteina razdvajanjem natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE)

Za analizu ekspresije ukupnih proteina koristila sam natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezu (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE), koja se temelji na razaranju disulfidnih veza u proteinu pomoću natrijevog dodecil sulfata (SDS). Time se postiže disocijacija proteina u pojedinačne polipeptidne lance koji se u tijeku elektroforeze, zahvaljujući maskiranju naboja, razdvajaju isključivo na temelju efektivnog promjera molekule, to jest, njegove molekulske mase (Balen i sur., 2011).

3.2.9.1. SDS-PAG elektroforeza

SDS-PAG elektroforeza izvedena je kako je opisao Laemmli (1970). Na početku sam pripremila otopine za gelove prema uputama iz Tablice 1, uz dodatak 10%-tne otopine SDS (100 μL u gel za razdvajanje i 50 μL u gel za sabijanje) i izlila ih u sendvič sastavljen od staklenih ploča. Nakon polimerizacije gelova, staklene ploče sam pričvrstila na elektrodni

nosač te prenijela u kadicu u koju sam ulila elektrodni pufer sastava 0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS. Uzorke za nanošenje na gel pripremila sam miješanjem određenih volumena proteinskih ekstrakata sa puferom za denaturaciju uzoraka (eng. *sample buffer*; 187,5 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 6% SDS, 5% β-merkaptoetanol, 0,1% BFB) kako bih postigla ujednačene koncentracije proteina u svim uzorcima. Nakon denaturacije 5 minuta na temperaturi od 95 °C na termobloku uz miješanje, uzorke sam nanijela u jažice gela. Za bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue* u jažice sam nanosila 12 µg proteina, a za bojanje gelova srebrovim nitratom 6 µg proteina po jažici. Elektroforeza se provodila u kadici *PROTEAN® II xi cell* (Bio-Rad) priključenoj na izvor vode kako bi se održala konstantna temperatura, prvih 45 minuta pri 100 V kako bi uzorci ušli u gel za razdvajanje, a kasnije pri 220 V do kraja.

Nakon elektroforeze uslijedilo je bojanje gelova i vizualizacija vrpce.

3.2.9.2. Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue* i srebrovim nitratom

Bojanje gela bojom *Coomassie Brilliant Blue* izvodila sam kako je opisano u Balen i sur. (2011). Nakon elektroforeze, gel sam preko noći inkubirala u otopini za bojenje (0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina), pri sobnoj temperaturi i na tresilici. Nakon toga je uslijedilo odbojavanje u otopini sastava 10% (v/v) octena kiselina i 20% (v/v) metanol, također na sobnoj temperaturi i na tresilici, pri čemu sam otopinu za odbojavanje mijenjala nekoliko puta, sve dok se pozadina gela nije u potpunosti obezbojila. Nakon toga gel sam izvadila iz otopine i skenirala.

Bojanje gela srebrovim nitratom izvodila sam kako je opisao Blum i sur. (1987). Nakon elektroforeze gel se 1 sat inkubirao u otopini za fiksiranje (50% etanol, 12% octena kiselina, 500 µL formaldehid i destilirana voda do 1 L), nakon čega sam ga 3 puta po 20 minuta ispirala u otopini 30%-tnog etanola. Uslijedila je obrada u otopini Na₂S₂O₃ u periodu od jedne minute, te ispiranje u redestiliranoj vodi 3 puta po 20 sekundi. Nakon toga gel je 20 minuta inkubiran u otopini za impregniranje (200 mg AgNO₃, 75 µL formaldehid i redestilirana voda do 100 mL), te ispiran s redestiliranom vodom 2 puta po 20 sekundi. Razvijanje vrpce provođeno je u otopini za razvijanje (6 g Na₂CO₃, 50 µL formaldehida, 2 mL otopine Na₂S₂O₃ i redestilirana voda), a nakon što su vrpce postale vidljive daljnje razvijanje

sam prekinula upotrebom stop otopine (50% etanol, 12% octena kiselina i destilirana voda). Nakon toga gel je bio spreman za skeniranje.

3.2.10. Imunodetekcija proteina na membrani

Imunodetekciji proteina na membrani prethodila je SDS-PAG elektroforeza. Prije elektroforeze pripremila sam gelove za mali sustav elektroforeze prema sastavu prikazanom u Tablici 2. U sendvič složen od staklenih ploča ulila sam prvo gel za razdvajanje te ga nadsvodila 20%-tnim etanolom kako bih spriječila kontakt sa zrakom. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, pripremila sam gel za koncentriranje, prije čega sam odlila dodani etanol i površinu gela isprala s redestiliranom vodom. Između ploča zatim sam stavila češljeve i ostavila gel da se polimerizira. Nakon polimerizacije, ploče s gelovima postavila sam na elektrodni nosač i u prostor između gelova ulila elektrodni pufer sastava 0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS. U jažice sam nanosila proteinske uzorke pomiješane s puferom za denaturaciju uzoraka, kako je opisano u poglavlju 3.2.10.1. Na gelove sam nanosila 10 µg proteina po jažici. Elektroforezu sam provodila u kadici *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad), prvih 15 minuta pri 100 V, nakon čega sam napon povećala na 200 V do kraja elektroforeze.

Tablica 2. Sastav gela za malu SDS-PAG elektroforezu.

	gel za razdvajanje (12%)	gel za koncentriranje (4%)
reH ₂ O	3,5 mL	3,05 mL
Tris-HCl	1,5 M; pH 8,8; 2,5 mL	1,25 mL
AA/Bis	4 mL	0,665 mL
10% SDS	100 µL	50 µL
10% APS	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL

3.2.10.1. Određivanje ekspresije antioksidacijskih enzima imunodetekcijom proteina na membrani

Nakon SDS-PAG elektroforeze, gel sam stavila u vertikalni sustav za elektroprijenos *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad), kako je opisano u Balen i sur.

(2011). U staklenu posudu ulila sam pufer za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol), te u njega položila otvoreni plastični okvir uređaja, crnom stranom prema dolje. Na njega sam stavila spužvicu i filtrirni papir *Whatmann*, te nitroceluloznu membranu koju sam prethodno namočila u redestiliranoj vodi. Nakon elektroforeze, gel sam prenijela na nitroceluloznu membranu, preklopila ga drugim filtrirnim papirom i spužvicom, te preklopila okvir uređaja pazeći da između membrane i gela ne zaostanu mjehurići zraka. Plastični sam okvir zatim postavila u uređaj na način da membrana bude okrenuta prema + elektrodi, te pokrenula prijenos koji je trajao jedan sat na 60 V. Nakon prijenosa membranu sam obojala bojom *Rouge Ponceau S*, te nakon ispiranja u destiliranoj vodi, grafitnom olovkom ucrtala biljege molekulskih masa. Potom sam membranu dodatno odbojila u 25 mL pufera TBS (eng. *Tris-buffered saline*, TBS; 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), te pripremila otopinu A koja se sastojala od 500 mL pufera PBS, 1% Tween 20 i 2% mlijeka u prahu (w/v) (za protutijela anti-APX, -CAT i -SOD), odnosno 5% (w/v) mlijeka u prahu (za protutijelo anti-peroksidazu iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP). Membrane sam inkubirala 60 minuta u 30 mL otopine A, nakon čega su membrane inkubirane u 30 mL otopine A uz dodatak primarnih protutijela na 4 °C preko noći (Tablica 3.). Idući sam dan membrane isprala 3 puta po 10 minuta s 20 mL otopine A, nakon čega je slijedila inkubacija membrana u otopini A uz dodatak 3 µL sekundarnih protutijela (Tablica 3.) u trajanju od 60 minuta. Membrane sam potom ispirala 2 puta po 10 minuta sa 20 mL otopine B sastavljene od 1x PBS-pufer i 1% Tween 20 te ih obradila otopinama za kemiluminiscenciju (*ECL Western Blotting Substrate*, Promega za CAT i HRP te *WesternSure Chemiluminescent Western Blotting reagent*, LI-COR Biosciences za APX i SOD). Na kraju je uslijedilo skeniranje membrana na uređaju za kemiluminiscenciju i njihova obrada.

Tablica 3. Prikaz protutijela i njihovih razrjeđenja korištenih za imunodetekciju antioksidacijskih enzima.

Analizirani enzim	Primarno protutijelo	Razrjeđenje	Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje
APX	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-APX (<i>rabbit polyclonal</i>) (Agrisera, Švedska)	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
CAT	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-CAT (<i>rabbit polyclonal</i>) (Agrisera, Švedska)	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000

SOD	Poliklonalno protutijelo kunići anti-Cu/Zn SOD (<i>rabbit polyclonal</i>) (Agrisera, Švedska)	1:1000	anti-kunići IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
HRP	Poliklonalno protutijelo ovčji anti-HRP (<i>sheep, polyclonal</i>) (Agrisera, Švedska)	1:2000	anti-ovčji IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000

3.2.10.2. Određivanje ekspresije proteina stresa imunodetekcijom

Postupak za određivanje ekspresije proteina stresa (Hsp70, hitinaza, ASR1 i Whirly) sličan je postupku za određivanje ekspresije antioksidacijskih enzima, kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Otopina A pripremljena je uz 5% (w/v) mlijeka u prahu, a korištena primarna i sekundarna protutijela prikazana su u Tablici 4. Za detekciju sam koristila otopinu za kemiluminiscenciju *ECL Western Blotting Substrate*, Promega.

Tablica 4. Prikaz protutijela i njihovih razrjeđenja korištenih za imunodetekciju proteina stresa.

Analizirani enzim	Primarno protutijelo	Razrjeđenje	Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje
Hsp70	Poliklonalno protutijelo kunići anti-Hsp70 (kućna izrada, ljubaznošću dr. sc. H. Fulgosija, IRB)	1:500	anti-kunići IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
ASR1	Poliklonalno protutijelo anti-ASR1 (Kalifa i sur. 2004, ljubaznošću Prof. D. Bar-Zvi)	1:2000	anti-kunići IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
hitinaza	Poliklonalno protutijelo kunići anti-hitinaza klasa I (<i>rabbit polyclonal class I chitinase</i>) (Agrisera, Švedska)	1:2000	anti-kunići IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000
<i>whirly1</i>	Poliklonalno protutijelo <i>whirly1</i> (kućna izrada, ljubaznošću prof. D. Bar-Zvi)	1:1000	anti-kunići IgG-HRP (Agrisera, Švedska)	1:30000

3.3. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardne pogreške. Za statističku obradu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (eng. *analysis of variance* – ANOVA), nakon čega sam provela post-hoc Duncan test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom sam smatrala razliku $p \leq 0,05$. Za to sam koristila računalni program *Statistica 12.0* (Stat Soft Inc., SAD).

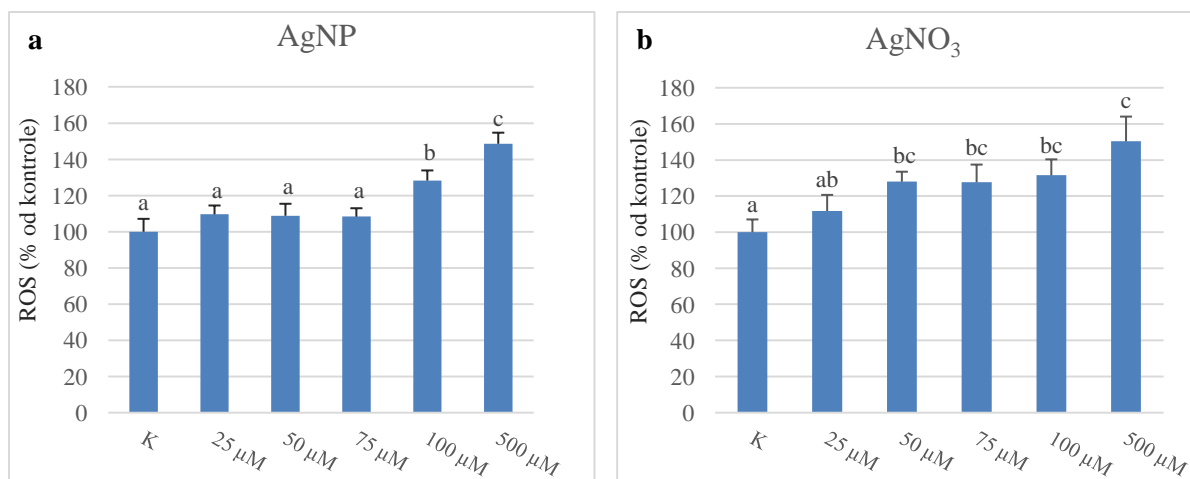
REZULTATI

4. REZULTATI

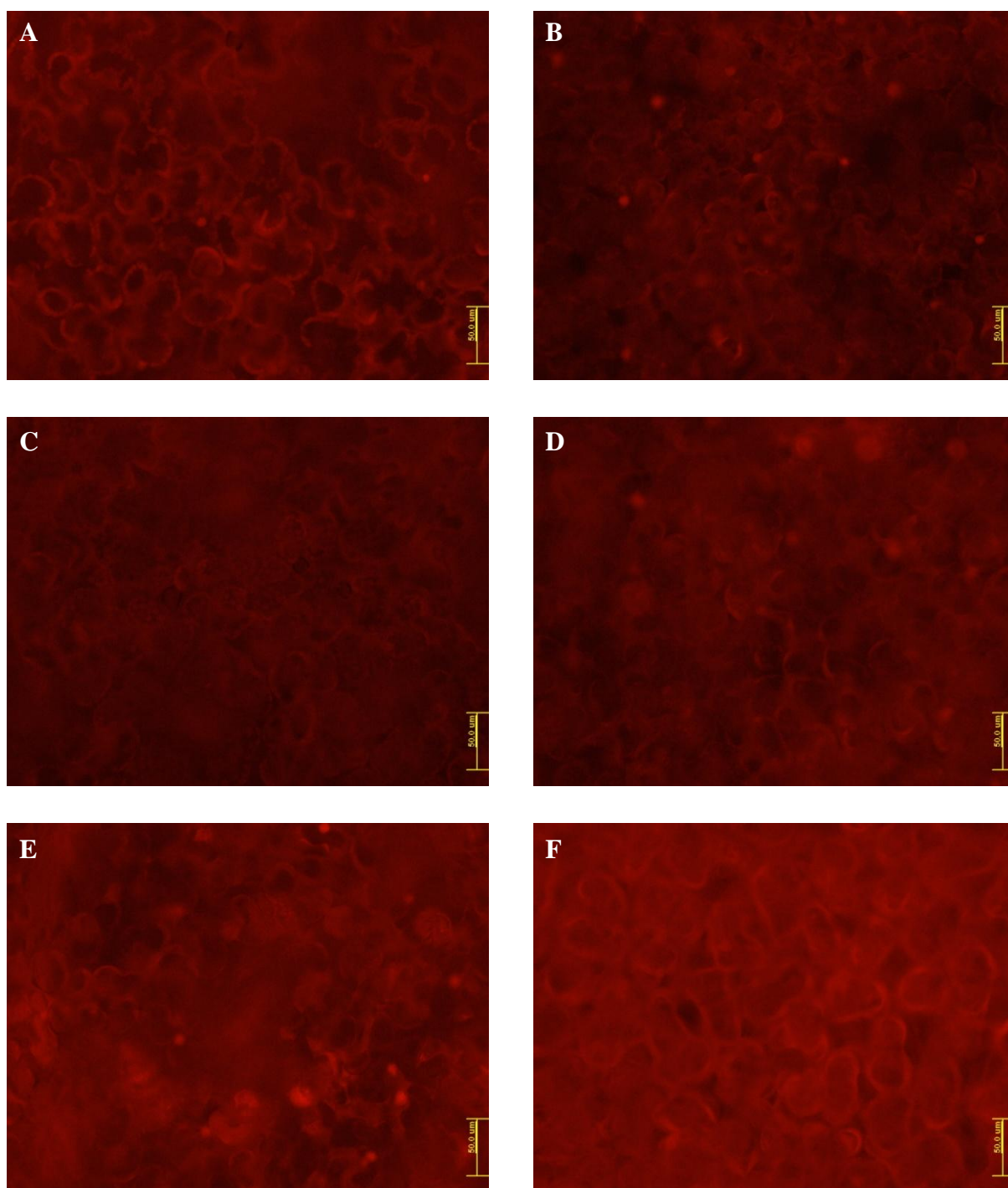
4.1. Dihidroetidij test

Reakcija ROS s dihidroetidijem omogućila je utvrđivanje razine oksidacijskog stresa u klijancima duhana tretiranim nanočesticama srebra i ionskim srebrom (Slike 3 i 4).

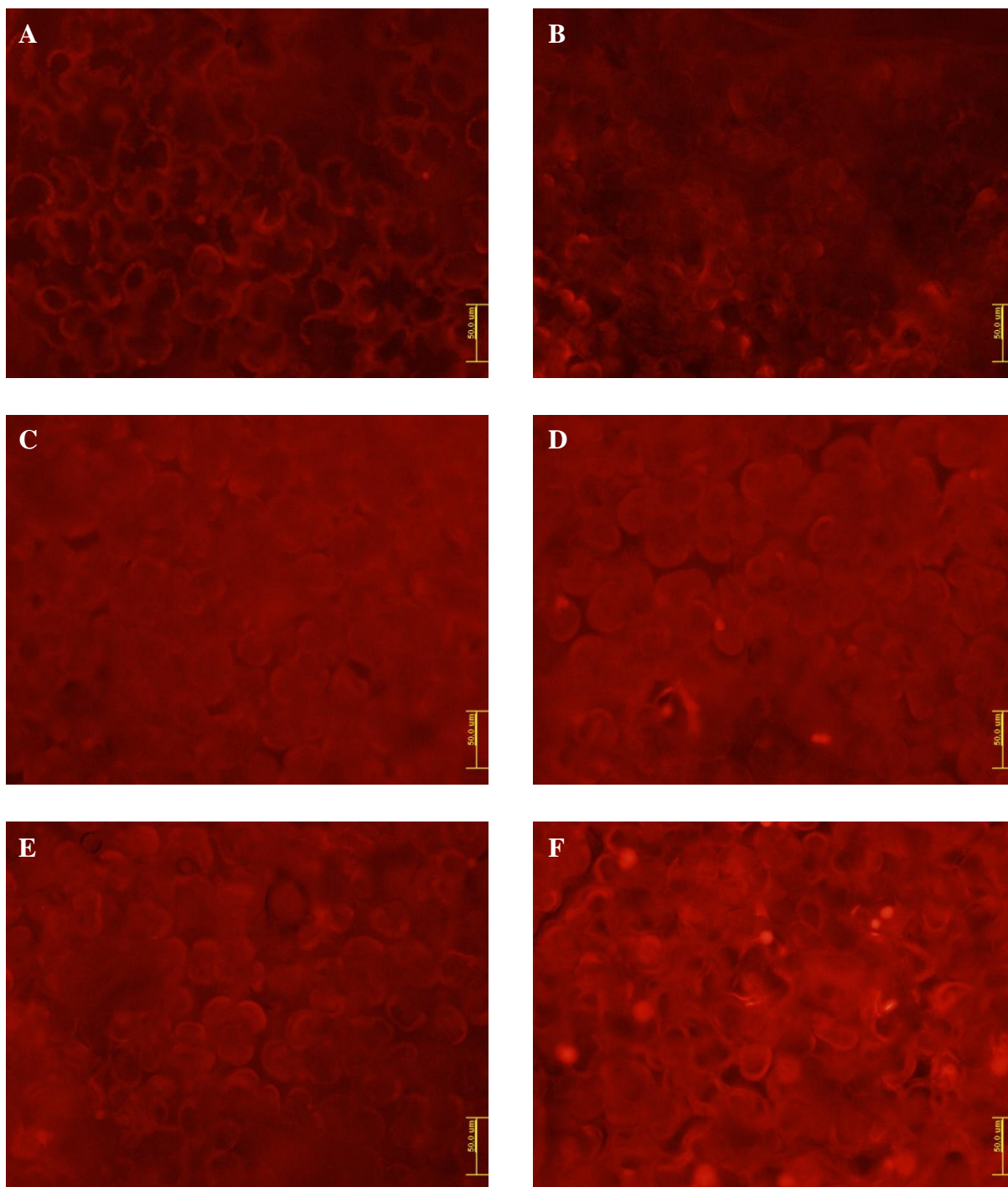
U klijancima koji su rasli na podlogama s AgNP porast razine ROS u odnosu na kontrolu vidljiv je samo pri koncentracijama od 100 i 500 μM (Slika 2a). Klijanci rasli na podlogama s AgNO_3 pokazali su značajno više razine ROS već od 50 μM koncentracije, a najveća vrijednost izmjerena je pri koncentraciji od 500 μM AgNO_3 (Slika 2b).



Slika 2. Razina ROS u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO_3 . Rezultati, prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak, srednje su vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjenjenog u 100 stanica \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.



Slika 3. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNP. Fotografije su snimljene pri povećanju od 400x. A – kontrola, B – 25 μ M, C – 50 μ M, D – 75 μ M, E – 100 μ M, F – 500 μ M. Bar = 50,0 μ m.

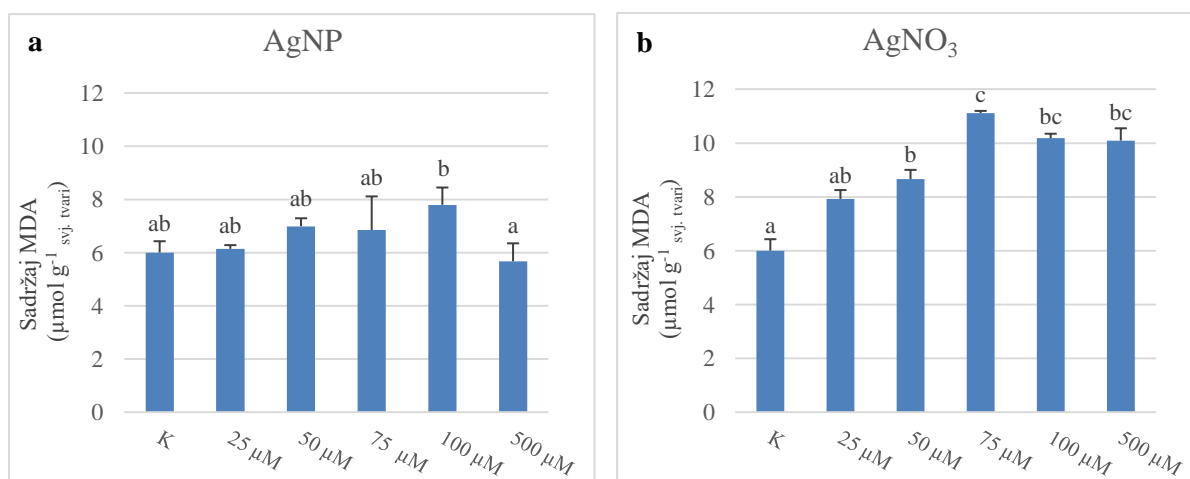


Slika 4. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNO_3 . Fotografije su snimljene pri povećanju od 400x. A – kontrola, B – 25 μM , C – 50 μM , D – 75 μM , E – 100 μM , F – 500 μM . Bar = 50,0 μm .

4.2. Sadržaj malondialdehida

Sadržaj malondialdehida u klijancima duhana mjerila sam zbog određivanja razine lipidne peroksidacije, jednog od pokazatelja oksidacijskog stresa.

Nanočestice srebra nisu izazvale statistički značajne promjene u razini lipidne peroksidacije tretiranih klijanaca u odnosu na kontrolu. Ipak, pri koncentraciji od 100 μM uzrokovale su blagi porast, a pri 500 μM blago sniženje razine lipidne peroksidacije (Slika 5a). Klijanci koji su rasli na podlogama s ionskim srebrom pri koncentracijama od 50 μM do 500 μM (Slika 5b) pokazuju značajan porast razine lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu. Najveću koncentraciju MDA pokazali su klijanci koji su rasli na podlozi sa 75 μM AgNO_3 .

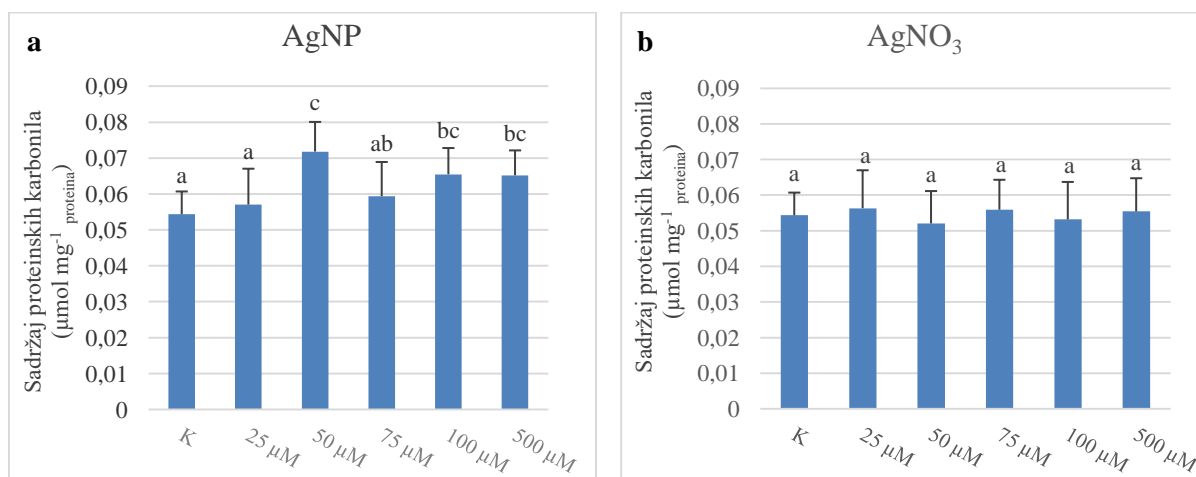


Slika 5. Sadržaj MDA u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO_3 . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.3. Sadržaj proteinskih karbonila

Sadržaj proteinskih karbonila mjerio se kako bi se odredila razina oksidacije proteina u klijancima duhana.

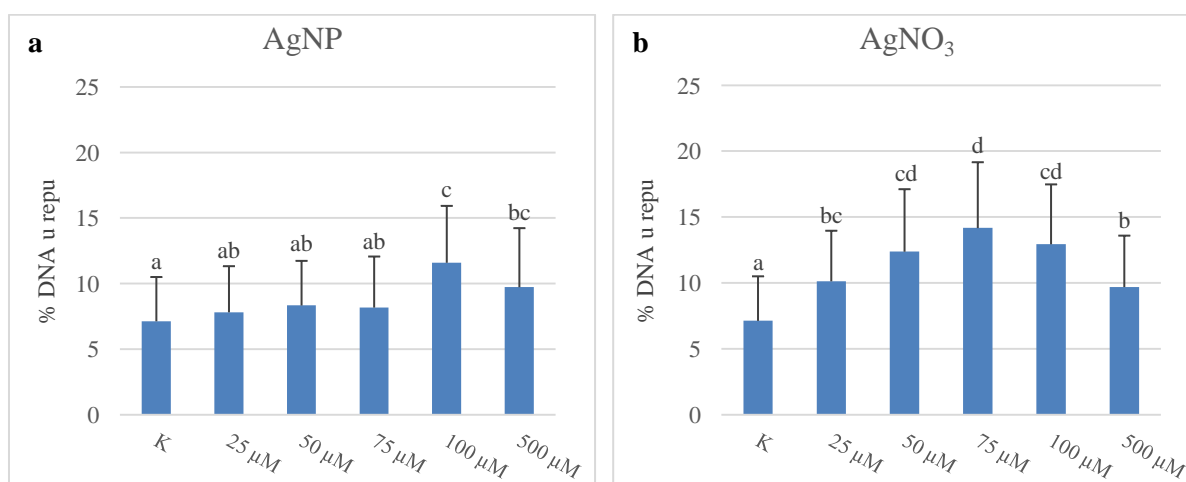
Razina oksidacije proteina značajno je porasla u klijancima raslim na podlozi s nanočesticama srebra, s izuzetkom klijanaca tretiranih sa 25 i 75 μM AgNP (Slika 6a). Pri tome su najveći porast u sadržaju proteinskih karbonila pokazali klijanci rasli na podlozi sa 50 μM AgNP. Klijanci izloženi djelovanju ionskog srebra nisu pokazali statistički značajnu promjenu u razini proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu (Slika 6b).



Slika 6. Sadržaj proteinskih karbonila u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.4. Comet test

Mjerenje postotka DNA u repu koristi se za određivanje razine oštećenja molekule DNA. Iz mjerenja je vidljivo da nanočestice srebra uzrokuju povećanje postotka DNA samo pri većim koncentracijama (100 i 500 μM), pri čemu je najveća vrijednost izmjerena u klijancima koji su rasli na podlogama sa 100 μM AgNP (Slika 7a). Ionsko srebro uzrokovalo je povećanje postotka DNA pri svim ispitanim koncentracijama (Slika 7b); najveće oštećenje molekule DNA pokazali su klijanci izloženi djelovanju 75 μM AgNO₃, dok su se vrijednosti postupno smanjivale pri većim koncentracijama.



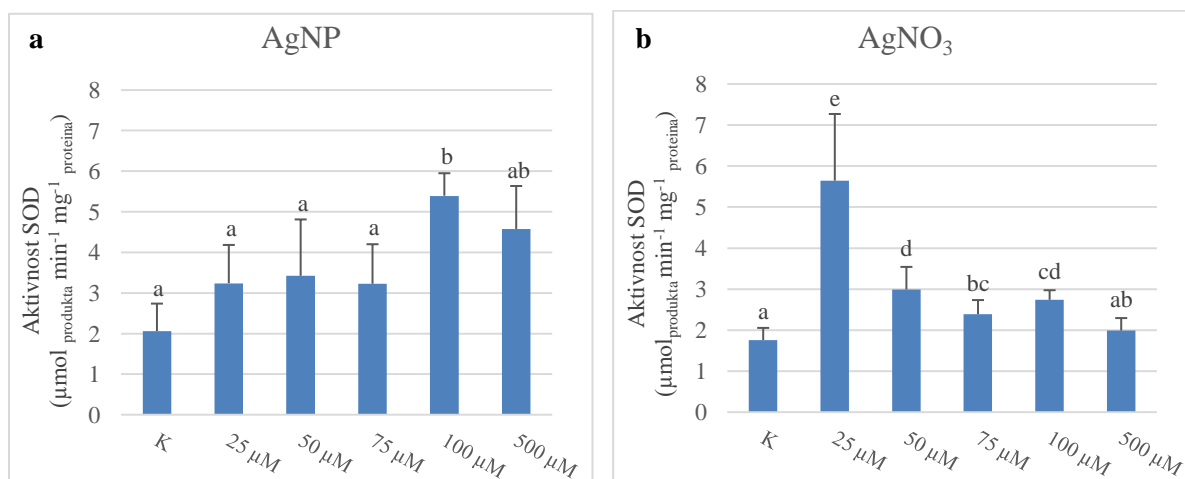
Slika 7. Postotak DNA u repu u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima

4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Superoksid dismutaza je enzim koji uklanja superoksidni radikal pretvarajući ga u vodikov peroksid i molekularni kisik.

U klijancima koji su rasli na podlogama s nanočesticama srebra značajno povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu utvrđeno je samo pri koncentracijama od 100 i 500 μM AgNP (Slika 8a). U klijancima izloženim ionskom srebru značajno povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu i najveća aktivnost u odnosu na ostale tretmane izmjerena je pri najnižoj koncentraciji AgNO₃ (25 μM), dok je aktivnost izmjerena pri najvećoj koncentraciji AgNO₃ (500 μM) vrlo slična kontroli (Slika 8b).

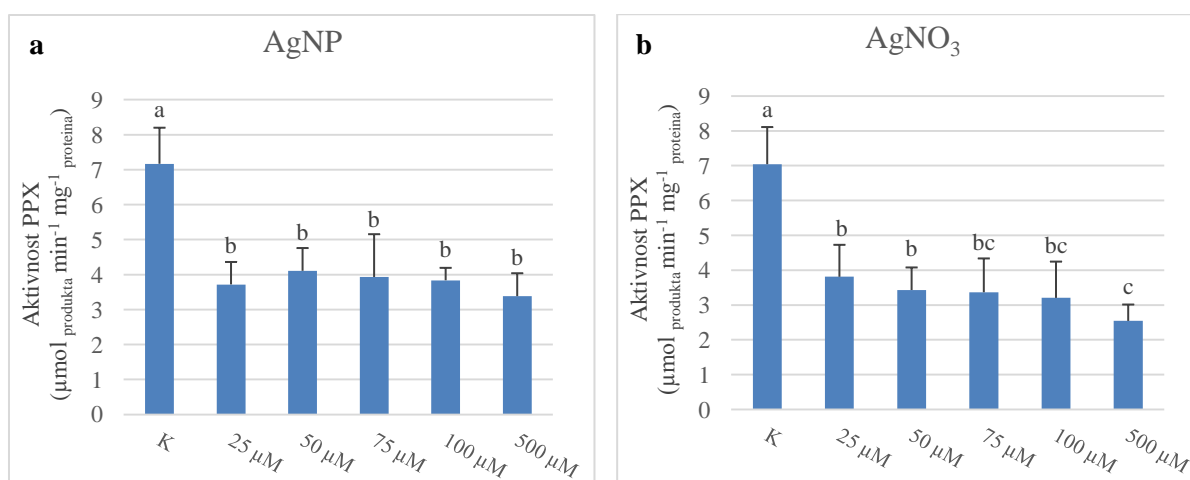


Slika 8. Aktivnost superoksid dismutaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

Pirogalol peroksidaza je enzim koji katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu, a aktivnost mu je određena spektrofotometrijski praćenjem nastanka produkta purpurogalina.

Aktivnost pirogalol peroksidaze značajno se smanjila u odnosu na kontrolu u tretiranim klijanacima duhana, bilo da su rasli na podlogama s dodatkom AgNP ili s dodatkom AgNO₃ (Slika 9. a i b). Najmanja vrijednost zabilježena je u klijancima raslim na podlozi s najvećom koncentracijom AgNO₃ (500 µM).

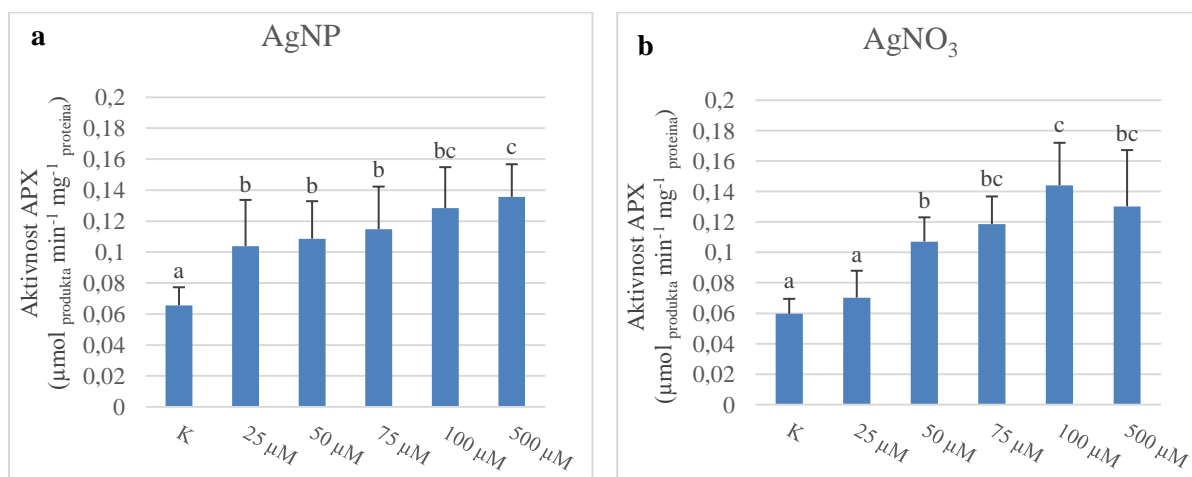


Slika 9. Aktivnost pirogalol peroksidaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.5.3. Aktivnosti askorbat peroksidaze

Askorbat peroksidaza još je jedan enzim koji služi uklanjanju vodikovog peroksida iz stanice, a aktivnost je praćena nastankom produkta oksidacije askorbinske kiseline.

Klijanci duhana koji su rasli na podlogama s nanočesticama srebra (Slika 10a) i ionskim srebrom (Slika 10b) pokazuju statistički značajan porast aktivnosti askorbat peroksidaze u odnosu na kontrolu, s izuzetkom klijanaca raslih pri 25 μM AgNO_3 . Najveći se porast vidi u klijancima tretiranim većim koncentracijama srebra, i to pri koncentraciji od 100 μM AgNO_3 te 100 i 500 μM AgNP .

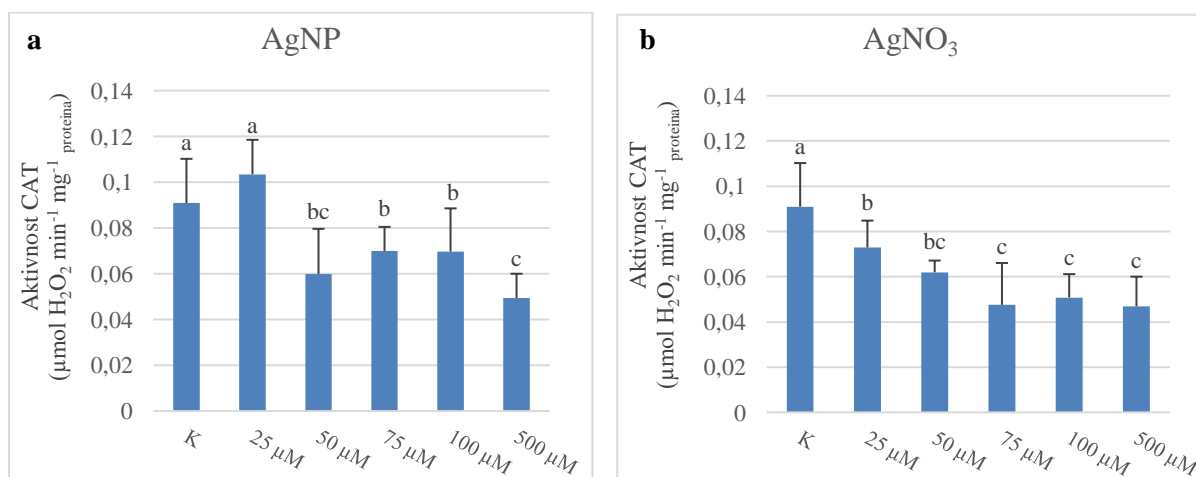


Slika 10. Aktivnost askorbat peroksidaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO_3 . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.5.4. Aktivnost katalaze

Katalaza je enzim koji katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik, a aktivnost je spektrofotometrijski određena praćenjem utroška vodikovog peroksida.

Statistički značajno smanjenje aktivnosti katalaze u odnosu na kontrolu vidljivo je u gotovo svim ispitanim uzorcima, bilo da su tretirani nanočesticama srebra (Slika 11a) ili ionskim srebrom (Slika 11b). Jedini su izuzetak klijanci koji su rasli na podlozi s AgNP najmanje koncentracije (25 μM), koji nisu pokazali statistički značajnu promjenu aktivnosti u odnosu na kontrolu.



Slika 11. Aktivnost katalaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

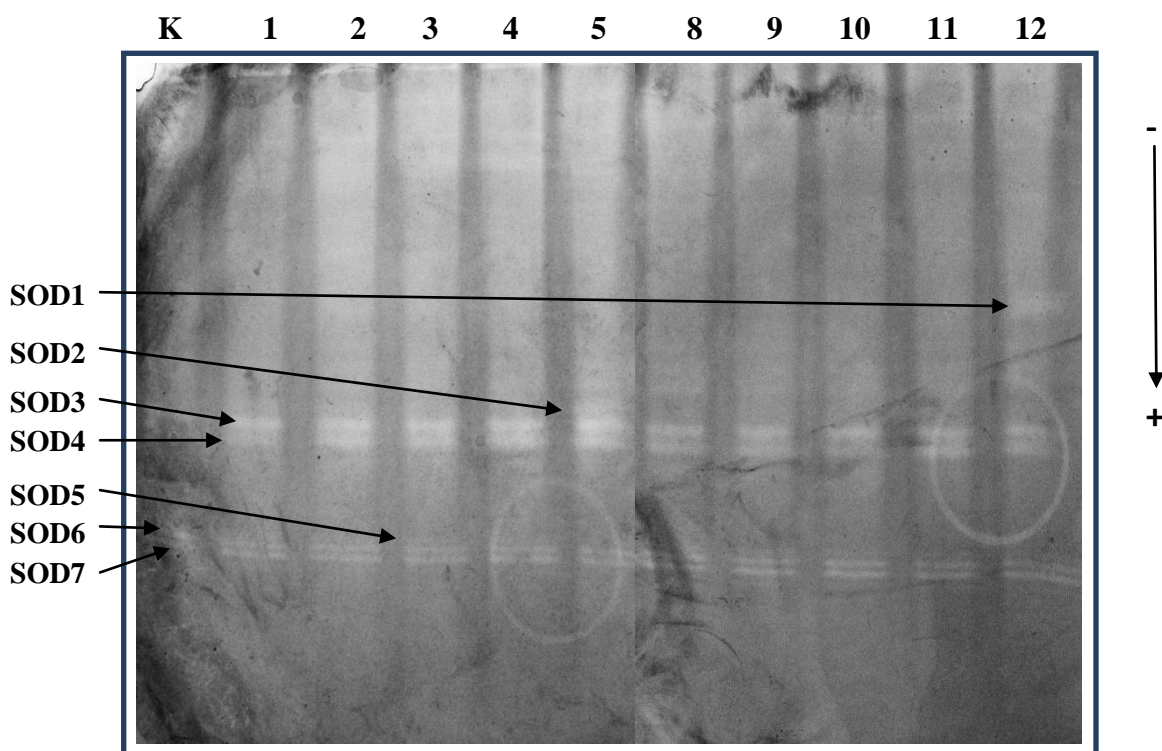
4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu

4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Aktivnost enzima superoksid dismutaze prikazana je na slici 12. Vidljiv je veći broj izoformi, koje su poredane prema rastućoj pokretljivosti u gelu i nazvane: SOD1, SOD2, SOD3, SOD4, SOD5, SOD6 i SOD7.

Intenzitet vrpce pojedine izoforme nije bio jednakog intenziteta u svakome od uzoraka. SOD1 bio je karakterističan samo za klijance koji su rasli na podlozi s najvećom koncentracijom AgNO_3 , dok je vrpca SOD2 bila slabog intenziteta u svim tretmanima osim pri 500 μM AgNP. Izoforma SOD3 uočljivija je u tretiranim klijanacima nego u kontroli, a intenzitet vrpce slabiji je pri tretmanu s ionskim srebrom nego s nanočesticama srebra; najjače je izražena u klijanacima tretiranim s 500 μM AgNP. Izoforma SOD4 nije bila prisutna u kontroli, ali je vidljiva u svim tretiranim klijancima; intenzitet vrpce postupno se pojačavao porastom koncentracije AgNP dok je pri svim koncentracijama AgNO_3 bila ujednačenog intenziteta. Vrpca SOD5 nije vidljiva u kontroli, dok je u tretiranim klijanacima prisutna pri koncentraciji od 75 μM AgNP i svim koncentracijama AgNO_3 s jednakim intenzitetom. Izoforme SOD6 i SOD7 nalaze se u kontrolnim i svim tretiranim klijancima i jednakog su intenziteta.

Za kontrolu je bila karakteristična odsutnost izoformi SOD1, SOD4 i SOD5. U klijanacima tretiranim AgNP bile su vidljive sve izoforme osim SOD1, i to s jačim intenzitetom u odnosu na kontrolu. U klijancima tretiranim AgNO_3 bile su prisutne sve navedene izoforme; vrpce SOD2, SOD3 i SOD4 bile su slabijeg intenziteta u odnosu na tretmane sa AgNP, ali i dalje jače izražene nego u kontroli.



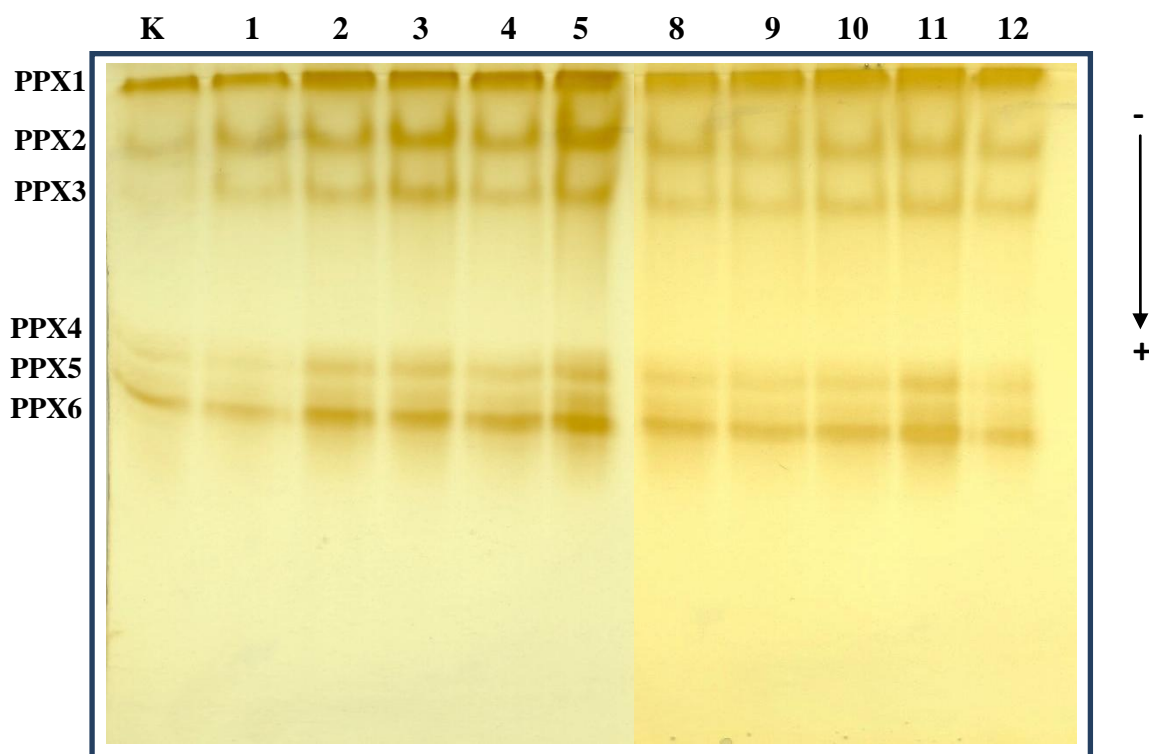
Slika 12. Aktivnost i izoforme superoksida dismutaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNO_3 i AgNP. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 8 – 25 μM AgNO_3 , 9 – 50 μM AgNO_3 , 10 – 75 μM AgNO_3 , 11 – 100 μM AgNO_3 , 12 – 500 μM AgNO_3 .

4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

Na slici 13. prikazana je aktivnost pirogalol peroksidaze u gelu. U analiziranim uzorcima nađeno je pet izoformi navedenoga enzima, koje su prema rastućoj pokretljivosti u gelu označene kao PPX1, PPX2, PPX3, PPX4, PPX5 i PPX6.

Između uzoraka tretiranih ionskim srebrom i nanočesticama srebra nije bilo razlike u broju izoformi PPX, no u svim tretmanima se pojavila jedna izoforma (PPX3) koja nije vidljiva u kontroli. Uzorci se međusobno razlikuju po intenzitetu pojedinih vrpca ovisno o primijenjenim koncentracijama AgNO_3 i AgNP. U klijancima koji su rasli na podlozi s AgNP vidljivo je postupno pojačanje intenziteta vrpca PPX2, PPX3 i PPX6 sa porastom koncentracije AgNP pri čemu najjači intenzitet pokazuju klijanci rasli na podlozi 500 μM AgNP, gdje se pojavljuje i dodatna vrpca PPX5 koja nije vidljiva pri ostalim koncentracijama

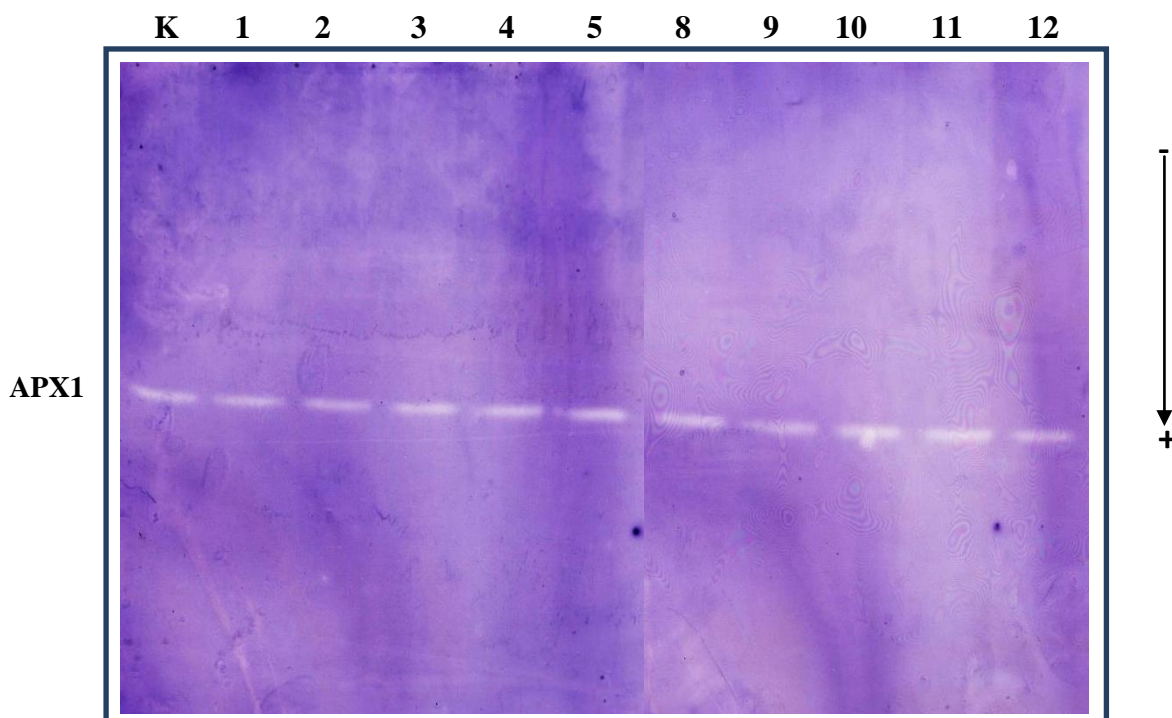
AgNP. Klijanci koji su rasli na podlozi s dodatkom AgNO₃ u usporedbi s kontrolom pokazali su vidljivo jači intenzitet svih vrpce, koji je ujednačen u svim ispitanim koncentracijama osim pri koncentraciji od 100 µM gdje su vrpce PPX4 i PPX6 bile jačeg intenziteta, a pojavila se i izoforma PPX5 koja nije bila vidljiva u tretmanima s ostalim koncentracijama.



Slika 13. Aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNO₃ i AgNP. K – kontrola, 1 – 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 – 500 µM AgNP, 8 – 25 µM AgNO₃, 9 – 50 µM AgNO₃, 10 – 75 µM AgNO₃, 11 – 100 µM AgNO₃, 12 – 500 µM AgNO₃.

4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Na slici 14. prikazana je aktivnost enzima askorbat peroksidaze u gelu. Vidljiva je samo jedna izoforma ovoga enzima označena sa APX1, koja je bila jednakog intenziteta u kontroli i svim tretiranim klijancima.

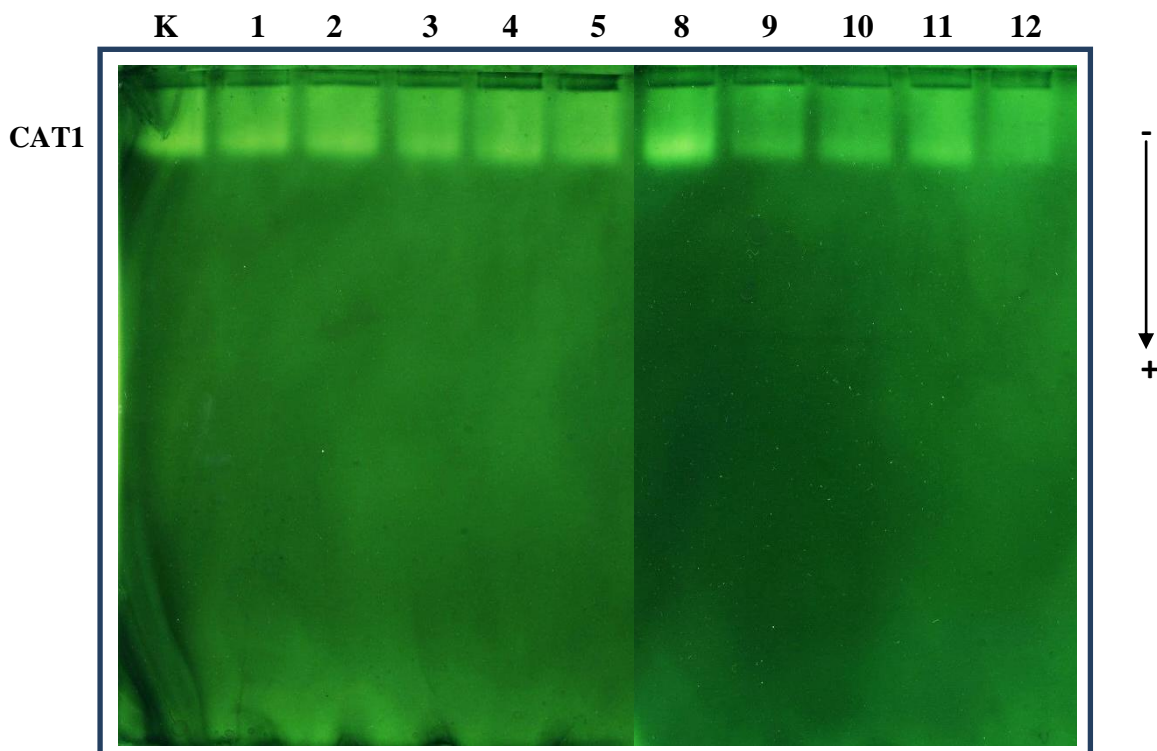


Slika 14. Aktivnost i izoforme askorbat peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNO_3 i AgNP. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 8 – 25 μM AgNO_3 , 9 – 50 μM AgNO_3 , 10 – 75 μM AgNO_3 , 11 – 100 μM AgNO_3 , 12 – 500 μM AgNO_3 .

4.6.4. Aktivnost katalaze

Na slici 15. prikazana je aktivnost katalaze u gelu. Na gelu se može uočiti jedna izoforma navedenog enzima (CAT1).

Izoforma CAT1 bila je prisutna u kontroli i svim tretiranim klijanacima duhana. U klijancima koji su rasli na podlogama s nanočesticama srebra intenzitet vrpce bio je jednak pri svim ispitanim koncentracijama ali malo slabiji u odnosu na kontrolu. U klijancima koji su izloženi ionskom srebru uočava se jak intenzitet vrpce pri koncentraciji od 25 μM , dok porastom koncentracija intenzitet vrpca postupno slabi te je pri koncentraciji od 500 μM najslabiji.



Slika 15. Aktivnost i izoforme katalaze u gelu nakon native PAG elektroforeze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNO_3 i AgNP. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 8 – 25 μM AgNO_3 , 9 – 50 μM AgNO_3 , 10 – 75 μM AgNO_3 , 11 – 100 μM AgNO_3 , 12 – 500 μM AgNO_3 .

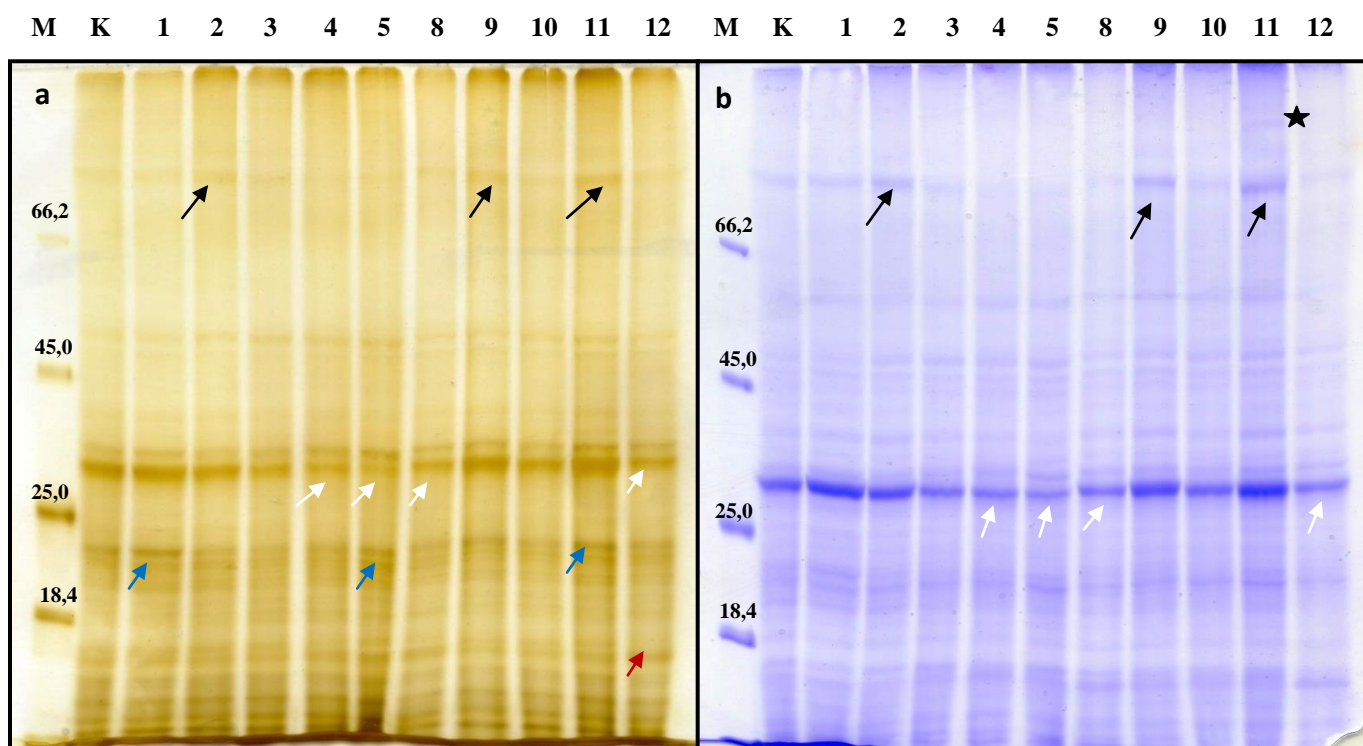
4.8. Ekspresija ukupnih proteina

Na slici 16. prikazana je ekspresija ukupnih proteina u klijancima duhana koji su rasli na podlogama s nanočesticama srebra i ionskim srebrom.

Na gelu bojanom srebrovim nitratom (Slika 16a) moguće je uočiti nekoliko razlika u ekspresiji proteina u odnosu na kontrolu. Za početak, klijanci koji su rasli na podlogama sa 50 μM AgNP, te 50 i 100 μM AgNO_3 pokazuju jaču ekspresiju proteina molekulske mase oko 90 kDa (crna strelica). Također, pri koncentracijama od 25 i 500 μM AgNP i 100 AgNO_3 vidljivo je pojačanje intenziteta obojenja vrpce pri 23 kDa (plava strelica). S druge strane, ekspresija proteina od otprilike 30 kDa smanjena je u tretmanima sa 100 i 500 μM AgNP te

25 i 500 μM AgNO_3 (bijela strelica). Uz to, vrpca proteina molekulske mase oko 16 kDa nije detektirana u klijanaca raslih na podlozi sa 500 μM AgNO_3 (crvena strelica).

Na gelu bojanom bojom CBB vidljive su iste promjene za vrpce od 90 i 30 kDa (Slika 16b) uočene na gelu bojanom srebrovim nitratom. Uz to, u klijanaca koji su rasli na podlozi koncentracije 100 μM AgNO_3 uočava se vrpca pri 110 kDa (zvjezdica), koja nije detektirana u ostalim uzorcima.

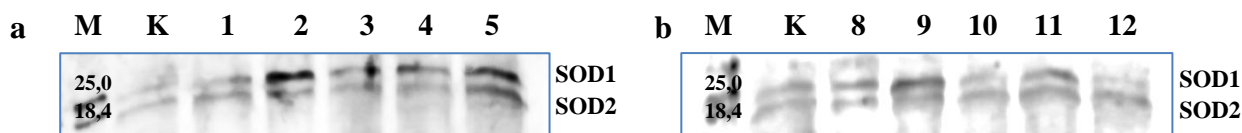


Slika 16. Ekspresija ukupnih topivih proteina u klijanacima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama s AgNP i AgNO_3 nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su bojani a) srebrovim nitratom i b) bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP , 2 – 50 μM AgNP , 3 – 75 μM AgNP , 4 – 100 μM AgNP , 5 – 500 μM AgNP , 8 – 25 μM AgNO_3 , 9 – 50 μM AgNO_3 , 10 – 75 μM AgNO_3 , 11 – 100 μM AgNO_3 , 12 – 500 μM AgNO_3 .

4.7. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima

4.7.1. Superoksid dismutaza

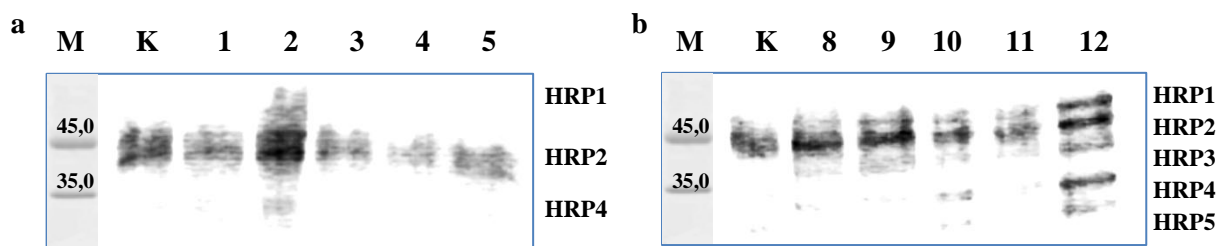
Na membranama koje prikazuju ekspresiju superoksid dismutaze (Slika 17) vidljive su dvije vrpce ovog enzima od 22 kDa (SOD1) i 19 kDa (SOD2), koje su bile prisutne u obje skupine tretiranih klijanaca. U klijancima koji su rasli na podlozi s AgNP obje su vrpce prisutne pri svim koncentracijama, ali s različitim intenzitetom; vrpca SOD1 najjače je izražena pri koncentraciji od 75 μ M, a SOD2 pri 500 μ M AgNP (Slika 17a). Klijanci tretirani AgNO₃ ne pokazuju velike razlike niti sa kontrolom niti međusobno u intenzitetu vrpce SOD1 i SOD2, koje su također detektirane pri svim ispitivanim koncentracijama ionskog srebra (Slika 17b).



Slika 17. Imunodetekcija superoksid dismutaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekulske mase (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μ M AgNP, 2 – 50 μ M AgNP, 3 – 75 μ M AgNP, 4 – 100 μ M AgNP, 5 – 500 μ M AgNP, 8 – 25 μ M AgNO₃, 9 – 50 μ M AgNO₃, 10 – 75 μ M AgNO₃, 11 – 100 μ M AgNO₃, 12 – 500 μ M AgNO₃.

4.7.2. Peroksidaza iz hrena

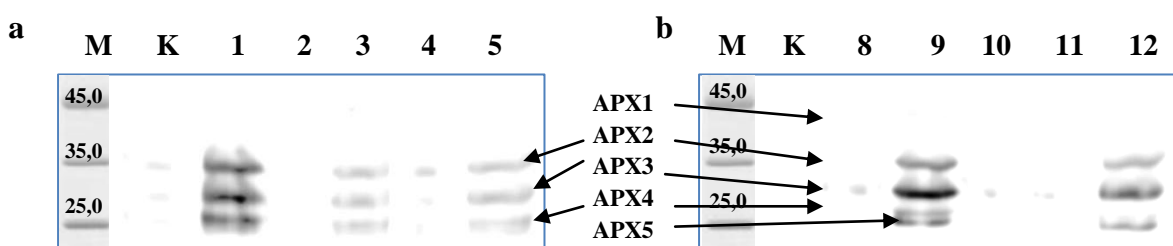
Na slici 18. prikazana je ekspresija proteina HRP. Ukupno je detektirano pet proteinskih vrpce molekularskih masa od 50 kDa (HRP1), 45 kDa (HRP2), 38 kDa (HRP3), 35 kDa (HRP4) i 30 kDa (HRP5). U klijancima raslim na podlozi s AgNP u svim je tretmanima bila prisutna vrpca HRP2, čiji je intenzitet najviše bio izražen pri koncentraciji od 50 μ M, dok je pri višim koncentracijama AgNP intenzitet vrpce bio slabiji (Slika 18a). Također, pri koncentraciji od 50 μ M AgNP uočljive su i vrpce HRP1 i HRP4 koje nisu bile prisutne u ostalim tretmanima. Klijanci koji su rasli na podlogama s AgNO₃ pokazali su veći broj vrpce HRP (Slika 18b); HRP1, HRP2 i HRP3 bile su prisutne su pri svim koncentracijama, dok su HRP4 i HRP5 vidljive samo u klijancima tretiranim sa 75 i 500 μ M AgNO₃. Pri tome je intenzitet svih navedenih vrpce najjače izražen pri tretmanu sa 500 μ M AgNO₃.



Slika 18. Imunodetektacija peroksidaze HRP u klijanima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μ M AgNP, 2 – 50 μ M AgNP, 3 – 75 μ M AgNP, 4 – 100 μ M AgNP, 5 – 500 μ M AgNP, 8 – 25 μ M AgNO₃, 9 – 50 μ M AgNO₃, 10 – 75 μ M AgNO₃, 11 – 100 μ M AgNO₃, 12 – 500 μ M AgNO₃.

4.7.3. Askorbat peroksidaza

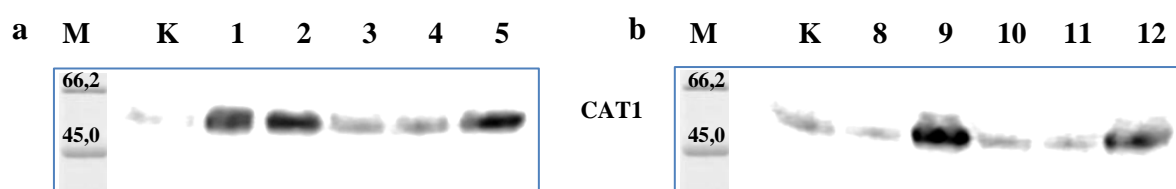
Imunodetekcijom askorbat peroksidaze na membrani uočava se pet vrpca ovoga enzima molekularnih masa od 38 kDa (APX1), 35 kDa (APX2), 30 kDa (APX3), 27 kDa (APX4) i 25 kDa (APX5) (Slika 19). U klijanima koji su rasli na podlogama s AgNP nisu detektirane vrpce APX1 i APX5. Najjači intenzitet ostalih vrpca je vidljiv nakon izlaganja 25 μ M AgNP, dok u uzorcima tretiranim 50 μ M AgNP nije bila vidljiva niti jedna vrpca (Slika 19a). U klijanima koji su rasli na podlogama s AgNO₃ zabilježeno je svih pet vrpca APX, iako je njihov intenzitet bio najizraženiji nakon tretmana s 50 μ M i 500 μ M (Slika 19b).



Slika 19. Imunodetektacija askorbat peroksidaze u klijanima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μ M AgNP, 2 – 50 μ M AgNP, 3 – 75 μ M AgNP, 4 – 100 μ M AgNP, 5 – 500 μ M AgNP, 8 – 25 μ M AgNO₃, 9 – 50 μ M AgNO₃, 10 – 75 μ M AgNO₃, 11 – 100 μ M AgNO₃, 12 – 500 μ M AgNO₃.

4.7.4. Katalaza

Na slici 20. prikazana je ekspresija katalaze dobivena imunodetekcijom primjenom odgovarajućeg protutijela. Na membranama je vidljiva jedna izoforma navedenog enzima od oko 57 kDa, označena kao CAT1. Ona se nalazila u svim uzorcima, a jače je bila izražena u klijancima tretiranim s AgNP (Slika 20a) u odnosu na tretmane s AgNO₃ (Slika 20b). Vrpce najjačeg intenziteta pojavile su se u klijancima izloženim djelovanju AgNP u koncentracijama od 25 μ M, 50 μ M i 500 μ M. Klijanci koji su rasli na podlogama s AgNO₃ uglavnom su pokazali vrpce CAT1 podjednakog intenziteta kao u kontroli, s iznimkom vrpce detektiranih nakon tretmana s 50 μ M i 500 μ M AgNO₃ (Slika 20b).

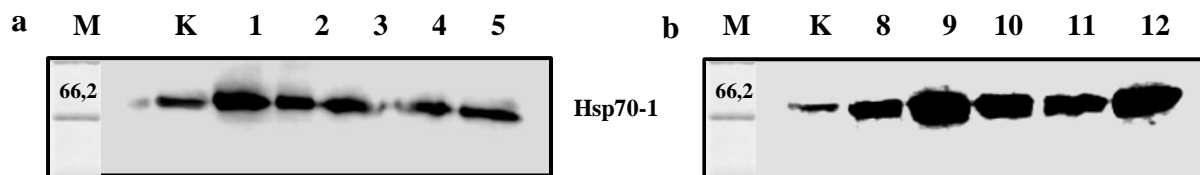


Slika 20. Imunodetekcija katalaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μ M AgNP, 2 – 50 μ M AgNP, 3 – 75 μ M AgNP, 4 – 100 μ M AgNP, 5 – 500 μ M AgNP, 8 – 25 μ M AgNO₃, 9 – 50 μ M AgNO₃, 10 – 75 μ M AgNO₃, 11 – 100 μ M AgNO₃, 12 – 500 μ M AgNO₃.

4.9. Ekspresija proteina stresa

4.9.1. Protein toplinskog šoka (Hsp70)

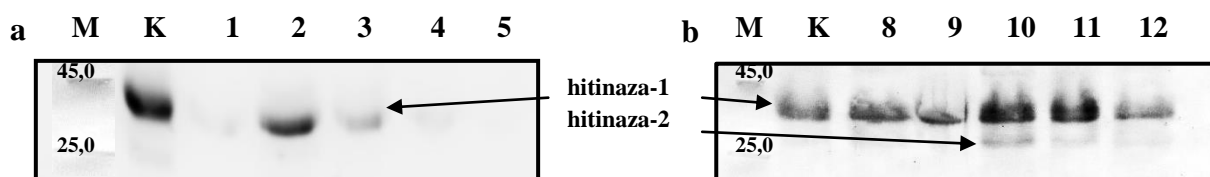
Na slici 21. prikazana je ekspresija proteina Hsp70 u tretiranim klijancima duhana. Vidljiva je jedna izoforma ovoga proteina (Hsp70-1) mase 70 kDa koja se pojavljuje nakon tretmana svim ispitanim koncentracijama AgNP i AgNO₃. U klijancima koji su rasli na podlozi s AgNP (Slika 21a) intenzitet vrpce slabijeg je intenziteta nego u klijancima koji su rasli na podlozi s AgNO₃, no i dalje je ekspresija jača u tretiranim klijancima u usporedbi s kontrolom. Najjači intenzitet pokazao klijanac tretiran s 25 μ M AgNO₃. Vrpce su vidljivo jačeg intenziteta od kontrole u klijancima koji su rasli na podlozi s AgNO₃ (Slika 21b), pri čemu se posebno ističu koncentracije od 50 μ M i 500 μ M.



Slika 21. Imunodetekcija proteina Hsp70 u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 8 – 25 μM AgNO₃, 9 – 50 μM AgNO₃, 10 – 75 μM AgNO₃, 11 – 100 μM AgNO₃, 12 – 500 μM AgNO₃.

4.9.2. Hitinaza

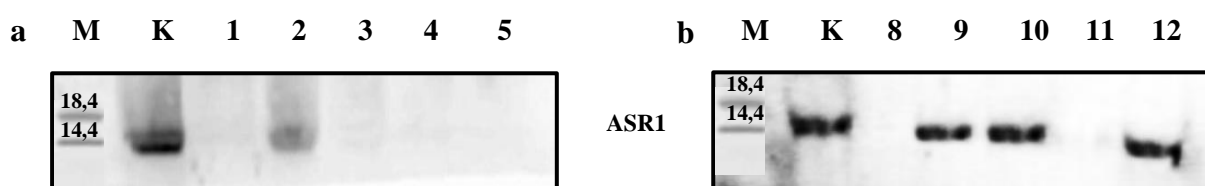
Ekspresija proteina hitinaze prikazana je na slici 22. Vidljive su dvije izoforme navedenog proteina molekulskih masa od 35 kDa (hitinaza-1) i 34 kDa (hitinaza-2). U klijancima koji su rasli na podlogama s AgNP (Slika 22a) prisutna je samo hitinaza-1, iako i ona nedostaje pri koncentracijama od 25 i 500 μM AgNP. Najjače je izražena nakon tretmana s 50 μM AgNP, dok je u ostalim uzorcima njezin intenzitet znatno slabiji. Obje su izoforme hitinaze detektirane u klijancima koji su rasli na podlogama s AgNO₃ (Slika 22b), iako ne pri svim koncentracijama. Tu se najviše ističe koncentracija od 75 μM gdje su vrpce obje izoforme najvećeg intenziteta. Hitinaza-2 je još prisutna pri koncentraciji od 100 μM, dok je u kontroli i ostalim uzorcima nema.



Slika 22. Imunodetekcija hitinaze u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 8 – 25 μM AgNO₃, 9 – 50 μM AgNO₃, 10 – 75 μM AgNO₃, 11 – 100 μM AgNO₃, 12 – 500 μM AgNO₃.

4.9.3. Protein induciran apscizinskom kiselinom i zrenjem (ASR1)

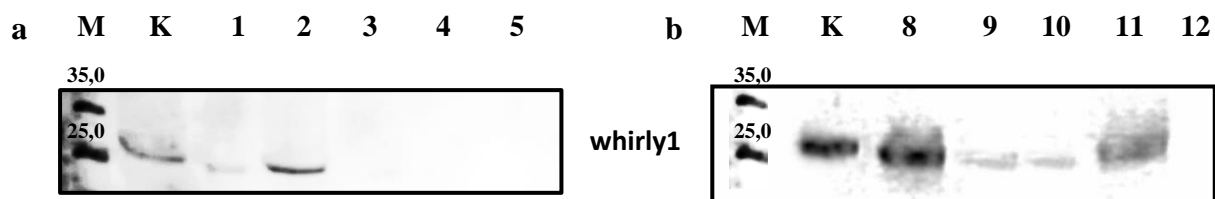
Slika 23. prikazuje ekspresiju proteina ASR1. U obje skupine klijanaca vidljiva je jedna izoforma ovoga proteina molekulske mase od 13 kDa, ali različitog intenziteta. U klijanacima koji su rasli na podlozi s AgNP ekspresija ASR1 vidljiva je samo pri koncentraciji od 50 μ M, pri čemu je intenzitet vrpce slabiji u odnosu na kontrolu (Slika 23a). Ekspresija ASR1 jača je u kljancima koji su rasli na podlozi s AgNO₃, iako vrpce nedostaju nakon izlaganja 25 μ M i 100 μ M AgNO₃ (Slika 23b).



Slika 23. Imunodetekcija proteina ASR1 u kljancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekulske mase (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μ M AgNP, 2 – 50 μ M AgNP, 3 – 75 μ M AgNP, 4 – 100 μ M AgNP, 5 – 500 μ M AgNP, 8 – 25 μ M AgNO₃, 9 – 50 μ M AgNO₃, 10 – 75 μ M AgNO₃, 11 – 100 μ M AgNO₃, 12 – 500 μ M AgNO₃.

4.9.4. Protein whirly1

Ekspresija proteina whirly1 prikazana je na slici 24. Njegova je molekulska masa 25 kDa. U klijanaca tretiranih s AgNP, protein whirly1 je detektiran samo pri koncentracijama od 25 i 50 μ M bez razlike u intenzitetu vrpce u odnosu na kontrolu (Slika 24a). U kljancima koji su rasli na podlozi s AgNO₃, protein whirly1 je bio najjače izražen pri koncentraciji od 25 μ M, nešto slabije pri koncentracijama od 50 μ M i 75 μ M, dok pri koncentraciji od 500 μ M nije detektiran (Slika 24b).



Slika 24. Imunodetekcija proteina whirly1 u klijancima *N. tabacum* koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) AgNO₃. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μ M AgNP, 2 – 50 μ M AgNP, 3 – 75 μ M AgNP, 4 – 100 μ M AgNP, 5 – 500 μ M AgNP, 8 – 25 μ M AgNO₃, 9 – 50 μ M AgNO₃, 10 – 75 μ M AgNO₃, 11 – 100 μ M AgNO₃, 12 – 500 μ M AgNO₃.

RASPRAVA

5. RASPRAVA

S obzirom na brzi napredak nanotehnologije i porast broja industrijskih grana u kojima se nanotehnologija primjenjuje, ne začuđuje činjenica da se istovremeno povećava i broj toksikoloških istraživanja nanomaterijala, pogotovo nanočestica srebra. Ipak, većina istraživanja je do sada provedena na bakterijama, algama, životinjama i ljudskim stanicama, a tek manji broj na višim biljkama. Kako su dosadašnji rezultati pokazali i pozitivne i negativne utjecaje nanomaterijala na biljke (Navarro i sur., 2008), evidentno je da su u ovome području otvorena još mnoga pitanja, a na neka od njih sam i ja pokušala ponuditi odgovor ovim radom.

Jedno od glavnih pitanja odnosi se na mehanizam toksičnosti nanočestica na organizme, uglavnom ispitujući potječe li toksičnost nanočestica od iona srebra (Ag^+) koji se otpuštaju s nanočestica ili od samih nanočestica (AgNP) (Yin i sur., 2011). Kako bih usporedila toksičnost ionskog i nanosrebra, sve sam analize na klijancima duhana simultano provodila s otopinama nanočestica srebra i srebrovog nitrata jednakih koncentracija.

(Cito)toksičnost AgNP pripisana je brojim mogućim mehanizmima koji uključuju narušavanje cjelovitosti stanične membrane (Suresh i sur., 2010), vezanje i oštećivanje proteina i DNA (Arora i sur., 2009) i stvaranje ROS (Hsin i sur., 2008; Carlson i sur., 2008; Kim i sur., 2009; Navarro i sur., 2008). U povoljnim okolišnim uvjetima ROS čine signalnu mrežu koja je očuvana u svim aerobnim organizmima i kontrolira široki spektar bioloških procesa, poput rasta, razvoja i odgovora na biotičke i abiotičke čimbenike (Mittler i sur., 2011). Da bi mogle obavljati uloge signalnih molekula, ROS u stanici moraju biti prisutne u netoksičnim količinama, što je uvjetovano ravnotežom između oksidansa i antioksidansa (Mittler i sur., 2004). Povećanje količine ROS u stanici može dovesti do oksidacijskog stresa. ROS se mogu detektirati i mjeriti na više načina, a u ovome radu ja sam ih mjerila DHE testom koji se temelji na interakciji superoksidnog radikala, ali i ostalih ROS, s dihidroetidijem. Rezultati su pokazali da se količina ROS u klijancima tretiranim nanočesticama srebra značajno povisila samo pri visokim koncentracijama, točnije, pri tretmanima s 100 i 500 μM AgNP. Povećana koncentracija ROS pri tretmanu s većim koncentracijama AgNP zabilježena je i u klijancima vrste *Oriza sativa* (Mirzajani i sur., 2013), korijenu vrste *Allium cepa* (Panda i sur., 2011) i biljci *Lemna gibba* (Oukarroum i sur., 2013). I u klijancima koji su rasli na podlogama s AgNO_3 izmjerene su povećane

koncentracije ROS koje su već od 50 μM AgNO_3 postupno rasle s porastom koncentracije ionskog srebra, što je također zabilježeno u korijenu *Allium cepa* (Panda i sur., 2011). Ovi rezultati upućuju na postojanje oksidacijskog stresa u biljci koji bi mogao dovesti do poremećaja u funkciji stanice i na veću toksičnost ionskog oblika srebra u odnosu na nanosrebro, što je već zabilježeno u ranijim istraživanjima (Nair i Chung, 2014a). Zanimljivo je uočiti i da su pri najvišim koncentracijama AgNP vrijednosti razine ROS bile jednake onima dobivenima pri istim koncentracijama AgNO_3 , što bi moglo ukazivati na toksičnost nanočestica srebra neovisno o otpuštanju Ag^+ iona (Yin i sur., 2011).

ROS su jaka oksidacijska sredstva i uzrok su oksidacijske štete na biomolekulama poput lipida i proteina, što oslabljuje integritet membrana i povećava propuštanje elektrolita te na kraju dovodi do smrti stanice (Anjum i sur., 2013). Višestruko nezasićene masne kiseline često su meta stvorenih slobodnih radikala što uzrokuje lipidnu peroksidaciju, a za posljedicu ima raspad lipidnih hidroperoksida i formiranje različitih reaktivnih aldehyda (Esterbauer i Cheeseman, 1990). Stupanj lipidne peroksidacije odredila sam mjerenjem sadržaja malondialdehyda, jednog od krajnjih produkata tog procesa. Dosadašnja istraživanja utjecaja AgNP na razinu MDA dala su kontradiktorne rezultate; povećana razina lipidne peroksidacije zabilježena je u kalusima kultivara pšenice (Barbasz i sur., 2016) te u klijancima riže (Nair i Chung, 2014b) i Arabidopsisa (Nair and Chung, 2014a), dok je značajno smanjenje razine MDA izmjereno u vrstama *Pelargonium zonale* (Hatami i Ghorbanpour, 2013) i *Gerbera jamesonii* (Kazemi i Ameri, 2012). U mom istraživanju, razina MDA u klijancima tretiranim nanočesticama srebra lagano je porasla pri koncentraciji od 100 μM , dok je pri 500 μM bila nešto niža nego u kontroli. Sličan rezultat zabilježen je i u biljci *Spirodela polyrhiza* (Jiang i sur., 2014), tretiranoj nanočesticama srebra te također u biljci *Elodea nuttallii*, izloženoj željezu (Xing i sur., 2010), gdje su autori takvu pojavu pripisali nekrozi tkiva i smrti stanica u kojima je onemogućeno daljnje nakupljanje MDA. S druge strane, u klijanaca tretiranih ionskim srebrom zabilježila sam postupan porast razine MDA od izlaganja koncentraciji od 50 μM do tretmana sa 75 μM AgNO_3 , nakon čega je uslijedio blagi pad, iako je razina MDA i dalje bila značajno viša nego u kontroli. Prilikom istraživanja utjecaja ionskog srebra u vrsti *Fragaria x ananassa* (Qin i sur., 2005) zabilježen je konstantni porast razine MDA povećanjem koncentracije AgNO_3 . S obzirom da pad koncentracije MDA u mojem slučaju nije od velikog statističkog značaja, za donošenje konačnog zaključka bilo bi potrebno provesti isto istraživanje s većim koncentracijama AgNO_3 , iako je pad vrlo vjerojatno rezultat propadanja tkiva izloženog jakim stresu.

Kao pokazatelj oksidacijskog stresa u biljci može poslužiti i karbonilacija proteina koja označava kovalentnu modifikaciju proteina potaknutu pojačanim stvaranjem ROS. Razinu oksidacije proteina odredila sam mjerenjem koncentracije proteinskih karbonila u stanicama. Značajan porast u koncentraciji karbonila zabilježila sam u klijancima duhana tretiranim nanočesticama srebra pri koncentracijama od 50, 100 i 500 μM , što ukazuje na pojavu oksidacijskih modifikacija proteina i postojanje oksidacijskog stresa pri tretmanima s većim koncentracijama AgNP. Slični su rezultati zabilježeni u klijancima duhana tretiranim kadmijem (Tkalec i sur., 2014), dok je u korjenčićima luka tretiranim nanočesticama srebra (AgNP-citrat) zabilježeno smanjenje koncentracije karbonila (Milošić, 2014). U istom je istraživanju korjenčića luka utvrđeno i smanjenje koncentracije proteinskih karbonila nakon tretmana s AgNO_3 , što je suprotno mojim rezultatima koji ne pokazuju promjenu u odnosu na kontrolu. S obzirom na manjak literaturnih navoda koji ispituju učinak nanočestica srebra na stvaranje proteinskih karbonila, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ove pojave temeljito razjasnile.

Genotoksični učinak nanočestica srebra moguće je utvrditi Comet testom koji određuje stupanj oštećenja molekule DNA mjerenjem postotka DNA u repu. U ovome istraživanju zabilježila sam povećanu razinu oštećenja DNA pri tretmanu klijanaca duhana najvišim koncentracijama AgNP (100 i 500 μM), pri čemu je zanimljivo uočiti da je veće oštećenje uzrokovano koncentracijom od 100 μM nego 500 μM AgNP. To je u skladu s već poznatim istraživanjima genotoksičnosti AgNP na biljkama, poput onoga od Ghosh i sur. (2012) koji su izmjerili povećane razine oštećenja DNA u korijenju luka i duhana, pri čemu se razina oštećenja postupno smanjivala povećanjem koncentracije AgNP. Taj su fenomen pripisali sposobnosti nanočestica da stvaraju aglomerate koji povećanjem koncentracije pokazuju tendenciju precipitacije. S obzirom da je poznato da AgNP u luku utječu na diobu stanica i stvaranje kromosomskih aberacija (Babu i sur., 2008; Kumari i sur., 2009), bilo bi svakako preporučljivo u budućnosti navedene parametre istražiti i u klijancima duhana. Također je potrebno istaknuti da su rezultati dobiveni Comet testom na klijacima izloženim djelovanju AgNP u potpunosti u skladu s rezultatima nastanka ROS i lipidne peroksidacije te djelomično u skladu s rezultatima oksidacije proteina, što ukazuje da ove AgNP stabilizirane citratnim omotačem izazivaju pojavu oksidacijskog stresa i oštećivanje biološki važnih makromolekula u biljnim stanicama ako se primjenjuju u višim koncentracijama. U klijancima tretiranim ionskim srebrom povećana razina oštećenja DNA bila je značajna već od najmanje koncentracije AgNO_3 (25 μM) i postupno je rasla sve do koncentracije od 75 μM , nakon čega

počinje postupni pad razine oštećenja, koja je ipak i pri višim koncentracijama bila značajno veća od kontrolne vrijednosti. Razinu oštećenja DNA na koriјenu luka tretiranom ionskim srebrom u svom su istraživanju pokušali izmjeriti i Panda i sur. (2011), no otopine AgNO₃ pokazale su se toliko toksičnima da su uzrokovale nekrozu jezgre i onemogućile detekciju kometa. I u tretmanima ionskim srebrom rezultati Comet testa koreliraju s rezultatima nastanka ROS i lipidne peroksidacije, što ukazuje da ionsko srebro izaziva oksidacijski stres u biljnim stanicama pri značajno nižim koncentracijama u odnosu na srebro primijenjeno u obliku nanočestica.

S obzirom na sve navedene negativne posljedice povišenih koncentracija ROS i oksidacijskog stresa, biljke su morale stvoriti učinkovite mehanizme obrane. Jedan oblik obrane čini poticanje serije reakcija detoksifikacije koje kataliziraju antioksidacijski enzimi (Zhang i sur., 2005). Prvi enzim na obrambenoj liniji je superoksid dismutaza, katalizator pretvorbe superoksidnog radikala u vodikov peroksid i molekularni kisik. U ovome istraživanju u klijancima tretiranim AgNP značajni sam porast aktivnosti SOD zabilježila samo pri koncentraciji od 100 μM, dok je pri 500 μM aktivnost bila povišena iako ne statistički značajno. Ipak, aktivnost SOD u gelu i imunodetekcija anti-SOD protutijelom pokazali su pojačani intenzitet izoformi ovoga enzima pri svim ispitanim koncentracijama AgNP u odnosu na kontrolu. Pri tretmanu nanočesticama srebra povećanje aktivnosti SOD nađeno je i u klijancima vrste *Ricinus communis* (Yasur i Rani, 2013), kao i u kalusu *Triticum aestivum* varijetet Raweta, osjetljivom na oksidacijski stres. S druge strane, kalus tolerantnog varijeteta Parabola nije pokazao značajne razlike u aktivnosti SOD (Barbasz i sur., 2016), a u vrsti *Eichhornia crassipes* zabilježena je znatna inhibicija ovoga enzima nakon izlaganja nanočesticama srebra (Rani i sur., 2016). Povećanje aktivnosti SOD u mom istraživanju stoga bi moglo upućivati na postojanje pojačanog oksidacijskog stresa u stanici pri tretmanu s AgNP, što je u skladu s rezultatima dobivenima za razinu ROS, MDA, karbonila i oštećenja DNA pri višim koncentracijama AgNP. Tretman klijanaca duhana ionskim srebrom uzrokovao je povećanje aktivnosti SOD pri svim koncentracijama, pri čemu je najveća aktivnost zabilježena pri 25 μM AgNO₃, nakon čega postupno pada. Iako aktivnost SOD u gelu i imunodetekcija ukazuju na slabiju ekspresiju izoformi SOD u odnosu na tretmane s AgNP, u klijancima tretiranim s AgNO₃ u gelu je zabilježena izoforma SOD1 koja nije detektirana u klijancima tretiranim s AgNP, što može objasniti jaču aktivnost navedenoga enzima nakon tretmana ionskim srebrom. Povećanje aktivnosti SOD u biljkama tretiranim s AgNO₃ potvrđuju i druga istraživanja, poput onoga na klijancima *Ricinus communis* (Yasur i

Rani, 2013). Važno je primijetiti i trend smanjivanja aktivnosti SOD porastom koncentracije AgNO_3 , do te mjere da se pri koncentraciji od 500 μM ne razlikuje od kontrole. Smanjenje aktivnosti SOD ukazuje na zasićenje antioksidacijskog sustava zbog velike koncentracije ROS (Van der Lubben i sur., 2003), i pokazatelj je oksidacijskog stresa.

S obzirom da u dismutaciji superoksidnog radikala kataliziranoj SOD kao jedan od produkata nastaje vodikov peroksid, u obranu stanice tu se uključuju drugi enzimi zaduženi za uklanjanje vodikovog peroksida. To su katalaza i razne peroksidaze i njihova je zadaća kataliziranje pretvorbe vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik (Ahmad i sur., 2010). Spektrofotometrijsko mjerenje pokazalo je značajno smanjenje aktivnosti PPX u tretiranim klijancima duhana, bilo da su rasli na podlogama s dodatkom AgNP ili s dodatkom AgNO_3 . Uspoređujući tretmane najvećih koncentracija nanočestica srebra i ionskog srebra, pad aktivnosti je nešto veći u klijancima tretiranim AgNO_3 . Ovi rezultati oprečni su ekspresiji PPX dobivenoj u gelu, kao i imunodetekciji protutijelom anti-HRP, gdje je u klijancima tretiranim ionskim i nanosrebrom detektiran veći broj izoformi i njihov pojačani intenzitet u odnosu na kontrolu. Smanjenje aktivnosti PPX pri tretmanu AgNP zabilježeno je i u biljci *Eichornia crassipes* (Rani i sur., 2016). Suprotno tome, istraživanja provedena na klijancima *Ricinus communis* (Yasur i sur., 2013) i biljci *Bacopa monnieri* (Krishnaraj i sur., 2012) pokazala su povećane aktivnosti PPX nakon tretmana s AgNP i AgNO_3 . Različitost u navedenim rezultatima može se pripisati činjenici da uloga PPX u biljci nije isključivo uklanjanje ROS nego i sudjelovanje u lignifikaciji, suberizaciji, katabolizmu auksina i zarastanju rana (Hiraga i sur., 2001).

Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti APX u klijancima duhana pokazalo je značajno povećanu aktivnost ovoga enzima u gotovo svim tretmanima s AgNP i AgNO_3 u odnosu na kontrolu, što ne odstupa mnogo od rezultata imunodetekcije, gdje sam uočila 5 izoformi čija je ekspresija u odnosu na kontrolu bila pojačana u svim tretmanima s AgNO_3 . Tri izoforme pojavile su se u tretmanima s AgNP, no niti jedna vrpca nije detektirana pri koncentracijama od 50 i 75 μM , iako na gelu i spektrofotometrijskim mjerenjima nisu uočena slična odstupanja. Povećanje aktivnosti APX zabilježeno je i u listovima *Pelargonium zonale* nakon tretmana s AgNP (Hatami i Ghorbanpour, 2013) i *Fragaria x ananassa* nakon tretmana s AgNO_3 (Qin i sur., 2005). Povećanje aktivnosti APX povezano je s kontrolom regulacije razine vodikovog peroksida i njegovim uklanjanjem u procesu oksidacijskog stresa potaknutog metalima (Qureshi i sur., 2005).

Aktivnost CAT smanjila se u klijancima duhana nakon tretmana nanočesticama srebra i ionskim srebrom, iako je smanjenje aktivnosti bilo jače izraženo nakon tretmana s ionskim srebrom. Jača inhibicija aktivnosti CAT nakon tretmana s AgNO_3 u usporedbi s AgNP zabilježena je i u kalusima kultivara pšenice (Barbasz i sur., 2016) i klijancima ricinusa (Yasur i Rani, 2013). To je vidljivo i u gelu gdje je detektirana jedna izoforma CAT, koja je u gotovo svim tretmanima smanjenog intenziteta u odnosu na kontrolu. Imunodetekcijom je također dobivena jedna izoforma ovoga enzima, no tu su vidljive razlike u intenzitetu vrpce određenih koncentracija, točnije, vrpce detektirane pri tretmanima s 25, 50 i 500 μM AgNP te 50 i 500 μM AgNO_3 su jače izražene u odnosu na kontrolu. Smanjena aktivnost CAT zabilježena je u biljci *Eichornia crassipes* (Rani i sur., 2016) tretiranoj s AgNP, kao i u korjenčićima *Allium cepa* pri tretmanima sa AgNP i AgNO_3 (Milošić, 2014).

Iako je ovo istraživanje pokazalo smanjenu aktivnost enzima PPX i CAT u klijancima duhana tretiranim nanočesticama srebra i ionskim srebrom, ne može se zaključiti da nije došlo do aktivacije antioksidacijskog sustava biljne stanice. Naime APX, koji je u ovom istraživanju pokazao pojačanu aktivnost, ima veći afinitet za vodikov peroksid od CAT i PPX te je njegova uloga iz tog razloga od veće važnosti za obranu biljke od ROS (Ahmad i sur., 2010).

U ovome su istraživanju uočene promjene u ekspresiji nekoliko proteina u klijancima koji su rasli na podlogama s AgNP i AgNO_3 . Zabilježena je pojačana ekspresija proteina od 23 i 90 kDa i smanjenje ekspresije proteina molekulske mase oko 30 kDa. Uz to, u klijancima tretiranim sa 100 μM AgNO_3 detektirana je vrpca od 110 kDa, dok u onima izloženim 500 μM AgNO_3 nije bio vidljiv protein od 16 kDa. Iako su detektirane promjene slične nakon izlaganja srebru u nano i ionskom obliku, jače su bile izražene u klijancima koji su rasli na podlogama s AgNO_3 , što se može povezati sa rezultatima dobivenim mjerenjima parametara oksidacijskog stresa. Promjenu u ekspresiji proteina uočili su i Pozveh i sur. (2014) u biljci *Brassica napus* tretiranoj s AgNP. Promjene koje su uočene mogle bi se pripisati promjeni ekspresije antioksidacijskih enzima i proteina stresa kao odgovoru na oksidacijski stres. Nadalje, neka su istraživanja pokazala da metali poput kadmija, olova, nikla i srebra mogu promijeniti ukupnu količinu proteina u biljci (Ewais, 1997; Rostami i Ehsanpour, 2009). U mom istraživanju smanjenje ukupne količine proteina vidljivo je u gelu obojanom bojom CBB u uzorku klijanca tretiranog najvećom primijenjenom koncentracijom AgNO_3 (500 μM), a vjerojatno je posljedica propadanja svih staničnih struktura uslijed izloženosti biljke jakom stresu.

Oksidacijski stres u biljci posebno utječe na ekspresiju proteina stresa. Iz ovog je istraživanja vidljivo da ekspresija proteina Hsp70 može biti inducirana nanočesticama srebra i ionskim srebrom te da jaču ekspresiju izaziva AgNO₃. Da nanočestice srebra mogu uzrokovati indukciju Hsp70 već je pokazano istraživanjem na vrsti *Drosophila melanogaster* (Ahamed i sur., 2010), a ovo istraživanje potvrđuje tezu da bi Hsp70 mogao biti biljeg u detekciji i kvantifikaciji nanotoksičnosti. Nadalje, ekspresija hitinaze jako se razlikuje u tretmanima klijanaca sa AgNP i AgNO₃. Dok je u tretmanu s AgNO₃ ekspresija pojačana pri koncentracijama od 75 i 100 µM gdje su detektirane i dvije izoforme ovoga proteina, u tretmanima s AgNP protein je detektiran samo pri 50 i 75 µM sa smanjenim intenzitetom. Pojačana ekspresija hitinaze u klijanima tretiranim AgNO₃ ukazuje na pojavu stresa. Gavanji i sur. (2013) pokazali su da AgNO₃ može štetno djelovati na hitinazu uzrokujući njenu deaktivaciju. Tu se sada postavlja pitanje ima li AgNP isti učinak na hitinazu u ispitivanim klijanima duhana ili manjak ekspresije ovoga proteina ukazuje da biljka nije u stanju stresa, što bi se trebalo dodatno istražiti. Tretmani klijanaca duhana AgNP i AgNO₃ nisu uzrokovali promjene u ekspresiji proteina ASR1 i whirly1.

Pokazatelji nastanka oksidacijskog stresa i aktivnost antioksidacijskih enzima ukazali su na štetan učinak AgNP i AgNO₃ u klijanima duhana, pri čemu je toksičnost AgNO₃ bila puno jače izražena u većini mjerenih parametara. Nadalje, toksičnost oba oblika srebra bila je ovisna o primijenjenoj koncentraciji, pri čemu je ionsko srebro pokazalo toksičnost već pri niskim koncentracijama, a toksičnost AgNP bila je izraženija pri višim koncentracijama. Na stresno stanje u klijanima duhana izloženim djelovanju AgNP upućuju i promjene u ekspresiji ukupnih proteina te pojačana ekspresija proteina stresa, Hsp70 i hitinaze. Promjene u proteinskoj slici još su jače izražene u klijanima tretiranim ionskim srebrom, što potvrđuje da AgNO₃ ima štetniji utjecaj na biljke od AgNP. To ipak ne nudi odgovor na pitanje o mehanizmu toksičnosti nanočestica srebra, pa će na ovome području svakako biti potrebna daljnja istraživanja.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. U klijancima duhana, AgNP pokazale su toksičnost samo pri višim istraživanim koncentracijama (100 i 500 μ M) kada su izazvale:
 - pojavu oksidacijskog stresa
 - oštećenje biološki važnih molekula (lipida, proteina i molekula DNA)
 - promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima
2. AgNP uzrokovale su promjene u ekspresiji ukupnih proteina te izazvale pojačanu ekspresiju jednog od istraživanih proteina stresa (Hsp70).
3. Toksičnost AgNO₃ bila je puno veća u klijancima duhana od toksičnosti AgNP u većini mjerenih parametara pri istim istraživanim koncentracijama.

POPIS LITERATURE

7. POPIS LITERATURE

Aebi M (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126.

Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ (2010) Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242:263-269.

Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(3):161-175.

Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2013) Silver nanoparticles in soil–plant systems. *Journal of Nanoparticle Research* 15:1896

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236:310-318.

Babu K, Deepa M, Shankar SG, Rai S (2008) Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a prefatory siren. *The Internet Journal of Nanotechnology* 2(2): 25-29.

Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Sameermahmood Z, Mohan V (2010) Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. *Methods in Molecular Biology* 610:245-61.

Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik-Rasol M (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb: Hrvatska sveučilišna naknada

Barbasz A, Kreczmer B, Oćwieja M (2016) Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO₃). *Acta Physiologiae Plantarum* 38:76.

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.

Benowitz NL (2010) Nicotine addiction. *The New England Journal of Medicine* 362(24):2295-2303.

Bhattarai KK, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar SP, Kaloshian I (2007) The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology* 144:312–323.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Boston RS, Viitanen PV, Vierling E (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology* 32:191-222

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brar DS i Khush GS (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. U: Basra AS (ur.) Mechanisms for plant growth and improved productivity – Modern approaches. New York, Mercel Dekker Inc, 229-278.

Breiman A (2014) Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Current Protein and Peptide Science* 15:232-244.

Cappadocia L, Maréchal A, Parent JS, Lepage E, Sygusch J, Brisson N (2010) Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in Arabidopsis organelle genome repair. *Plant Cell* 22:1849-1867

Cappadocia L, Parent JS, Sygusch J, Brisson N (2013) A family portrait: structural comparison of the Whirly proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Solanum tuberosum*. *Acta Crystallographica* 69(11):1207-1211.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B* 112:13608-13619

Castegna A, Drake J, Pocernich C, Butterfield DA (2003) Protein carbonyl levels – An assessment of protein oxidation. U: Hensley K, Floyd RA (ur.) *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*. Totowa, Humana Press Inc. 161-168.

Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35(4):1011-1019.

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. U: Colowick SP, Kaplan NO (ur.) *Methods in Enzymology*. New York, Academic press 764–775.

Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42(12):3066-74.

Domijan AM, Abramov AY (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis-implication to mechanism of cell toxicity. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43(6):897-904.

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186:407-421.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11:81-128

Ewais EA (1997) Effect of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum* 39(3):403-410.

Flick CE, Evans DA (1984) Tobacco. U: Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y (ur.) *Hand book of plant cell culture*. London, Collier Macmillan Publishers 606-630.

Ganapathi TR, Suprasanna P, Rao PS, Bapat VA (2004) Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology* 3:171-184.

Gavanji S, Aziz HA, Larki B, Mojiri A (2013) Computational prediction and analysis of interaction of silver nitrate with chitinase enzyme. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences* 1(4):50-62.

Ghosh M, Jothiramajayam M, Sinha S, Chakraborty A, Mallick SK, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2012) In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research* 749:60-69.

Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerova K (2004) Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research* 559:49-57.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.

Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress-and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant Physiology* 143:617-628.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.

Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, Javed S (2013) Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5(1):21-29.

Hatami M, Ghorbanpour M (2013) Effect of nanosilver on physiological performance of *Pelargonium* plants exposed to dark storage. *Journal of Horticultural Research* 21(1):15-20.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125:189-198.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohoshi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42:462-468.

Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters* 179(3):130-139.

Ivanković M (2011) Nanomaterijali i nanoproizvodi – mogućnosti i rizici. *Polimeri: časopis za plastiku i gumu* 32(1):23-28.

Jiang HS, Qiu XN, Li GB, Li W, Yin LY (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(6):1398-1405.

Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004) The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal* 381(2):373-8.

Kazemi M, Ameri A (2012) Postharvest life of cut gerbera flowers as affected by nano-silver and acetylsalicylic acid. *Asian Journal of Biochemistry* 7:106-111.

Kim IS, Kim YS, Yoon HS (2012) Rice ASR1 protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells* 33:285-293.

Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY (2009) Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology In Vitro* 23:1076-1084.

Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry* 47:651-658.

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment* 407:5243-5246.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lansdown AB (2002) Silver I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care* 11:125-130.

Lanje AS, Sharma SJ, Ponde RB (2010) Synthesis of silver nanoparticles: a safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2:478-483.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Schacter E (1994) Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233:346-357.

Li H, Poulos TL (1994) Structural variation in heme enzymes: a comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures. *Structure* 2(6):461-4.

- Milošić A (2014) Utjecaj čestica nanosrebra na rast i pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour A (2013) Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88:48-54.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science* 16:300-309.
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry* 212:540-546.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10):2346-53.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- Nair PM, Chung IM (2014a) Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research International* 21(14):8858-8869.
- Nair PM, Chung IM (2014b) Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 112:105-113.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867-880.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology* 42:8959-8964.
- Nowack B, Bucheli TD (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 50:5-22.
- Oukarroum A, Barhoumi L, Pirastru L, Dewez D (2013) Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(4):902-907.

- Panda KK, Achary VM, Krishnaveni R, Padhi BK, Sarangi SN, Sahu SN, Panda BB (2011) In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology In Vitro* 25:1097-1105.
- Pozveh ZT, Razavizadeh R, Rostami F (2014) Changes occurring in canola (*Brassica napus* L.) in response silver nanoparticles treatment under *in vitro* conditions. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 4(3):797-807.
- Qin Y, Zhang S, Zhang Lm Zhu D, Syed A (2005) Response of *in vitro* strawberry to silver nitrate (AgNO_3). *Horticultural Science* 40:747-751.
- Qureshi MI, Israr M, Abdin MZ, Iqbal M (2005) Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 53:185-193
- Rani PU, Yasur J, Loke Karthik S, Dutta D (2016) Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiologiae Plantarum* 38(2):58.
- Rostami F, Ehsanpour AA (2009) Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* culture. *Malaysian Applied Biology* 38(2):46-54.
- Sharma D, Masison DC (2009) Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein and Peptide Letters* 16(6):571-581.
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82:291-295.
- Sies H. (1985) Oxidative stress, Introductory remarks. U: Sies H (ur.) Oxidative Stress. London, Academic Press, 1-8.
- Suresh K, Sivakumar K, Vijayaanand MA, Rajalingam K, Rajkamal G (2010) Anti-lipidperoxidative and antioxidant effects of *Zingiber officinale* roscoe root extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced oral carcinogenesis. *Pharmacology online* 2:689-701.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43:84-93.
- Tkalec M, Štefanić PP, Cvjetko P, Šikić S, Pavlica M, Balen B (2014) The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS ONE* 9(1): e87582.
- Van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Coos Verhoef J, Junginger HE (2003) Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine* 28:1400-1408.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Rejeski D, Hull MS (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6:1769-1780.

Willekens H, Inze D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1:207-228.

Woodbury WA, Spencer K, Stahlmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 44:301-305.

Xing W, Li D, Liu G (2010) Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:873-878.

Yasur J, Rani PU (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research* 20:8636-8648.

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology* 45(6):2360-2367.

Zhang HY, Jiang YN, He ZY, Ma M (2005) Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Plant Physiology* 162:977-984.

<http://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-assessment-report-nan031f.html> (18.05.2016.)

<http://www.nanodb.dk/en/search-database/> (18.05.2016.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. travnja 1990. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Tituša Brezovačkog i Gimnaziju Lucijana Vranjanina. 2009. godine sam upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, program koji objedinjuje znanja iz područja biologije i kemije s metodičkim i pedagoškim predmetima koji su potrebni za kvalitetan rad profesora u školi. U tijeku studija sam odradila metodičke prakse u OŠ Sesevetska Sela i VII. gimnaziji u Zagrebu, gdje sam stekla iskustvo rada s učenicima. 2013. i 2014. godine sam sudjelovala u organizaciji i izvedbi „Noći biologije“, edukativno-zabavne manifestacije Biološkog odsjeka s ciljem promocije znanosti. 2015. godine sam sudjelovala na 24. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera. U slobodno vrijeme sam volontirala u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam pomagala u inventarizaciji staklenika i ostalim poslovima po potrebi.

Kongresna priopćenja:

Pavličić, Ivana; Biba, Renata; Smrečki, Neven; Pulić, Ivana; Matković-Čalogović, Dubravka; Popović, Zora. Kompleksi Co(II), Ni(II) i Cu(II) s N-cikloheksiliminodiacetamidom. 24. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka/Ukić, Šime; Bolanča, Tomislav (ur.). Zagreb: HKD/HDKI, 2015. 98-98 (poster, domaća recenzija, sažetak).